

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2005 年 4 月 21 日 (21.04.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/035753 A1

(51) 国際特許分類: C12N 15/09,
C07K 16/18, A61K 39/395, A61P 7/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/013062

(22) 国際出願日: 2003 年 10 月 10 日 (10.10.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒115-8543 東京都北区浮間 5 丁目 5 番 1 号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 服部 有宏 (HATTORI, Kunihiro) [JP/JP]; 〒412-8513 静岡県御殿場市 駒門 1 丁目 1 3 5 番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 小嶋 哲郎 (KOJIMA, Tetsuo) [JP/JP]; 〒412-8513 静岡県御殿場市 駒門 1 丁目 1 3 5 番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 宮崎 太郎 (MIYAZAKI, Taro) [JP/JP]; 〒412-8513 静岡県御殿場市 駒門 1 丁目 1 3 5 番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 添田 哲弘 (SOEDA, Tetsuhiro) [JP/JP]; 〒412-8513 静岡県御殿場市 駒門 1 丁目 1 3 5 番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 妹尾 千明 (SENOO, Chiaki) [JP/JP]; 〒412-8513 静岡県御殿場市 駒門 1 丁目 1 3 5 番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 名取 修 (NATORI, Osamu) [JP/JP]; 〒412-8513 静岡県御殿場市 駒門 1 丁目 1 3 5 番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 糟谷 恵子 (KASUTANI, Keiko)

[JP/JP]; 〒412-8513 静岡県御殿場市 駒門 1 丁目 1 3 5 番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 石井 慎也 (ISHII, Shinya) [JP/JP]; 〒412-8513 静岡県御殿場市 駒門 1 丁目 1 3 5 番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP).

(74) 代理人: 清水 初志, 外 (SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒300-0847 茨城県土浦市 卸町 1-1-1 関鉄つくばビル 6 階 Ibaraki (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: DOUBLE SPECIFIC ANTIBODIES SUBSTITUTING FOR FUNCTIONAL PROTEIN

(54) 発明の名称: 機能蛋白質を代替する二重特異性抗体

(57) Abstract: A bispecific antibody substituting for a ligand for a I type interferon receptor comprising two types of molecules having AR1 and AR2 chains is successfully isolated. Further, a bispecific antibody binding to both of blood coagulation factor IX/activated blood coagulation factor IX and blood coagulation factor X and substituting for the function of blood coagulation factor VIII/activated blood coagulation factor VIII enhancing an enzyme reaction is successfully constructed.

(57) 要約: AR1鎖, AR2鎖の二種の分子から成るI型インターフェロン受容体に対するリガンド機能代替二重特異性抗体の分離に成功した。また、血液凝固第IX因子/活性化血液凝固第IX因子及び血液凝固第X因子の双方に結合し、酵素反応を増強させる血液凝固第VIII因子/活性化血液凝固第VIII因子の作用を代替する二重特異性抗体を作製することに成功した。



- 1 -

明細書

機能蛋白質を代替する二種特異性抗体

5 技術分野

本発明は、機能蛋白質を代替する二種特異性抗体に関する。詳しくはヘテロ受容体に対するリガンドの機能を代替する二種特異性抗体、酵素反応を増強する補因子の作用を代替する二種特異性抗体、および該抗体を有効成分として含有する医薬組成物に関する。

10

背景技術

抗体は血中での安定性が高く、抗原性も低いことから医薬品として注目されている。その中には二種類の抗原を同時に認識できる二種特異性抗体がある。二種特異性抗体は提唱されて久しい。しかしながらこれまでに、NK細胞、マクロファージ、T細胞の retargeting を目的とするなど、二種類の抗原を単に繋ぐだけの抗体しか報告されていない（非特許文献8参照）。例えば、臨床試験が行なわれている MDX-210 は、Fc γ RI を発現している monocyte 等を HER-2/neu を発現している癌細胞に retargeting する二種特異性抗体であるに過ぎない。従って現在まで、二種特異性抗体を生体内で機能する蛋白質の代替手段として利用した例は

15

20

なかった。

生体内で機能する蛋白質の1つとして、受容体に対するリガンドが挙げられる。これらのリガンドとしては、インターロイキン (IL) -2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 15、エリスロポエチン (EPO)、成長ホルモン (GH)、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF)、トロンボポエチン (TPO)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF)、マクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF)、インターフェロン (IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ など)、毛様体神経向性因子 (CNTF)、

25

- 2 -

白血病抑制因子 (LIF)、Oncostatin M、カルジオトロピン-1 (CT-1)、腫瘍壊死因子 (TNF) などが挙げられる。これらの受容体では、リガンドが結合することによって、二量体あるいは数量体を形成する受容体分子の距離・角度に変化が生じ、細胞内にシグナルを伝え得ると考えられている。つまり適切な抗受容体抗体は、リガンドによる受容体の二量体化もしくは数量体化を模倣できる抗体となりうる。既にホモ二量体から成る TP0 受容体 (MPL) (特許文献 1 および非特許文献 1 参照)、EP0 受容体、GH 受容体、G-CSF 受容体に対してリガンド代替作用を示すモノクローナル抗体が報告されている。これらの抗体はそれぞれ、血小板減少時の血小板数回復作用、貧血時における赤血球増多作用、低身長症の成長促進作用、あるいは好中球減少症における好中球回復作用を示すと考えられ、医薬への応用が期待されている。

しかしながら、ヘテロ二量体を形成する受容体の場合は、二種あるいは数種の受容体分子の複合体を形成させる必要があるため、一般的な抗体ではリガンド機能の代替を期待できない。この目的には二種類の受容体分子を二本の腕でそれぞれ認識出来る上記の二種特異性抗体が適すると考えられるが、報告例は未だなかった。

また、生体内で機能する蛋白質の 1 つとして、補因子 (cofactor) が挙げられる。補因子としては、例えば、組織因子 (TF)、血液凝固第 V 因子 (F. V)、活性化血液凝固第 V 因子 (F. Va)、血液凝固第 VIII 因子 (F. VIII)、活性化血液凝固第 VIII 因子 (F. VIIIa)、トロンボモデュリン (TM)、プロテイン S (PS)、プロテイン Z (PZ)、ヘパリン、補体 C4b、補体制御タンパク H 因子、membrane cofactor protein (MCP)、complement receptor 1 (CR1) 等が挙げられる。

これらのうち、F. VIII/F. VIIIaは、十分なF. IXaの活性発現に必要な補因子である。Scheifflinger Fらは、ある種の抗F. IX/F. IXa抗体に、chromogenic assayにおいてF. IXaによるF. X活性化を促進する作用があることを見出している (特許文献 2 参照)。しかしながら、F. VIII欠乏血漿の凝固回復能測定においては、こ

の抗体単独による凝固回復能は示されておらず、外来的にF. IXaを添加した状態でのみ凝固回復能を示している。

F. VIIlaは、F. IXaと相互作用するだけでなくF. Xとも相互作用することが知られている（非特許文献6および7参照）。この点で、Scheifflinger Fらの抗体は、

- 5 F. VIII/F. VIIlaの機能を十分に代替しているといえず、その活性も不十分であると推測される。

本発明者らは、鋭意研究の結果、機能蛋白質の作用を代替する二種特異性抗体の作製に成功し、本発明に至った。

- 10 (特許文献1) 米国特許出願公開第98/17364号明細書
(特許文献2) 国際公開第01/19992号
(特許文献3) 米国特許第4, 474, 893号公報
(特許文献4) EP404, 097号
(特許文献5) 国際公開第93/11161号
- 15 (特許文献6) 特願2002-112369号公報
(特許文献7) 特願2003-012648号公報
(特許文献8) 特開平5-304992号公報
(特許文献9) 特開平2-145187号公報
(特許文献10) 特開平5-213775号公報
- 20 (特許文献11) 特開平10-165184号公報
(特許文献12) 特開平11-71288号公報
(特許文献13) 特表2002-518041号公報
(特許文献14) 特表平11-506310号公報
(特許文献15) 特開平5-199894号公報
- 25 (特許文献16) 特表平10-511085号公報
(特許文献17) 特開平5-184383号公報

(非特許文献 1) Deng D ら著、「Blood」、1998年、Vol. 92、No. 6、
p. 1981-1988

(非特許文献 2) Nilsson IM ら著、「J. Intern. Med.」、1992年、
Vol. 235、p. 25-32

5 (非特許文献 3) Löfqvist T ら著、「J. Intern. Med.」、1997年、
Vol. 241、p. 395-400

(非特許文献 4) 第24回日本血栓止血学会学術集会 学術専門部会 血友病標
準化検討部会 ミニシンポジウム、2001年、<http://www.jsth.org>

(非特許文献 5) Medical Bulletin #193 1994

10 (非特許文献 6) Mertens K ら著、「Thromb. Haemost.」、1999年、Vol. 82、
p. 209-217

(非特許文献 7) Lapan KA ら著、「Thromb. Haemost.」、1998年、Vol. 80、
p. 418-422

(非特許文献 8) Segal DM ら著、「Journal of Immunological Methods」、
15 2001年、Vol. 248、p. 1-6

(非特許文献 9) Bos R およびNieuwenhuitzen W 著、「Hybridoma」、1992
年、Vol. 11、No. 1、p. 41-51

(非特許文献 10) Brennan M ら著、「Science」、1985年、Vol. 229、
No. 1708、p. 81-3

20 (非特許文献 11) Karpovsky B ら著、「J. Exp. Med.」、1984年、
Vol. 160、No. 6、p. 1686-701

(非特許文献 12) Suresh MR ら著、「Methods Enzymol.」、1986年、
Vol. 121、p. 210-28

(非特許文献 13) Massimo YS ら著、「J. Immunol. Methods」、1997年、
25 Vol. 201、p. 57-66

(非特許文献 14) Brennan M ら著、「Science」、1985年、Vol. 229、p.

81

(非特許文献 1 5) Shalaby MR ら著、「J. Exp. Med.」、1992年、Vol. 175、
p. 217-25

(非特許文献 1 6) Holliner P ら著、「Proc. Natl. Acad. Sci. USA」、
5 1993年、Vol. 90、p. 6444-8

(非特許文献 1 7) Ridgway JB ら著、「Protein Eng.」、1996年、Vol. 9、
p. 617-21

(非特許文献 1 8) Hammerling U ら著、「J. Exp. Med.」、1968年、
Vol. 128、p. 1461-73

10 (非特許文献 1 9) Kurokawa T ら著、「Bio/Technology」、1989年、Vol. 7、
p. 1163

(非特許文献 2 0) Link BK ら著、「Blood」、1993年、Vol. 81、p. 3343

(非特許文献 2 1) Nitta T ら著、「Lancet」、1990年、Vol. 335、p. 368-

71

15 (非特許文献 2 2) deLeij L ら著、「Foundation Nationale de
Transfusion Sanguine, Les Ulis France」、1990年、p. 249-53

(非特許文献 2 3) Le Doussal JM ら著、「J. Nucl. Med.」、1993年、
Vol. 34、p. 1662-71

(非特許文献 2 4) Stickney DR ら著、「Cancer Res.」、1991年、Vol. 51、
20 p. 6650-5

(非特許文献 2 5) Weiner LM ら著、「Cancer Res.」、1993年、Vol. 53、
p. 94-100

(非特許文献 2 6) Kroesen BJ ら著、「Br. J. Cancer」、1994年、Vol. 70、
p. 652-61

25 (非特許文献 2 7) Weiner GJ ら著、「J. Immunol.」、1994年、Vol. 152、
p. 2385

- 6 -

(非特許文献 28) Suresh MR ら著、「Proc. Natl. Acad. Sci. USA」、
1986年、Vol. 83、p. 7989-93

(非特許文献 29) Milstein C および Cuello AC 著、「Nature」、1983年、
Vol. 305、p. 537

5 (非特許文献 30) Xiang J ら著、「Mol. Immunol.」、1990年、Vol. 27、
p. 809

(非特許文献 31) Bebbington CR ら著、「Bio/Technology」、1992年、
Vol. 10、p. 169

(非特許文献 32) Huse WD ら著、「Science」、1989年、Vol. 246、
10 p. 1275

(非特許文献 33) McCafferty J ら著、「Nature」、1990年、Vol. 348、
p. 552

(非特許文献 34) Kang AS ら著、「Proc. Natl. Acad. Sci. USA」、1991
年、Vol. 88、p. 4363

15

発明の開示

本発明は、機能蛋白質の作用を代替する二種特異性抗体の提供を課題とする。より詳しくは、ヘテロ受容体分子を含む受容体に対するリガンド機能を代替する二種特異性抗体、および酵素反応を増強する補因子の機能を代替する二種特異性抗体の提供を課題とする。

20

本発明者らは鋭意研究を行った結果、AR1鎖、AR2鎖の二種の分子から成るI型インターフェロン受容体に対するリガンド機能代替抗体の分離に成功した。即ち本発明者らは、ヘテロ分子からなる受容体に対してリガンド機能代替作用を有する二種特異性抗体を初めて分離することに成功した。

25

さらに本発明者らは鋭意研究を行った結果、F. IX/F. IXa及びF. Xの双方に特異的に結合し、F. VIIlaの補因子作用、すなわちF. IXaによるF. X活性化を促進する

- 7 -

作用を代替する二種特異性抗体を見出すことに成功した。即ち、本発明者らは、酵素および該酵素の基質の両者を認識し、該酵素の補因子の機能を代替し得る二種特異性抗体の作製に成功した。

上記ヘテロ分子からなる受容体のリガンド蛋白質、および上記酵素補因子は共に、機能蛋白質であることから、本発明者らによって初めて、機能蛋白質の代替機能を有する二種特異性抗体が実際に開発されたものと言える。

即ち本発明は、機能蛋白質を代替する二種特異性抗体に関する。より詳しくは、ヘテロ分子を含む受容体に対してリガンド機能代替作用を有する二種特異性抗体、および酵素反応を増強する補因子の機能を代替する二種特異性抗体に関し、より具体的には、

- 〔１〕 機能蛋白質の代替機能を有する二種特異性抗体、
- 〔２〕 ヘテロ分子を含む受容体に対してリガンド機能代替活性を有する二種特異性抗体、
- 〔３〕 受容体がサイトカイン受容体である〔２〕に記載の抗体、
- 15 〔４〕 サイトカイン受容体がインターフェロン受容体である〔３〕に記載の抗体、
- 〔５〕 インターフェロン受容体がⅠ型インターフェロン受容体である〔４〕に記載の抗体、
- 〔６〕 Ⅰ型インターフェロン受容体がAR1鎖及びAR2鎖を含んでいることを特徴とする〔５〕に記載の抗体、
- 20 〔７〕 ヘテロ分子を含む受容体が二量体である〔２〕に記載の抗体、
- 〔８〕 抗AR1鎖抗体の可変領域と、抗AR2鎖抗体の可変領域とを含む、〔６〕に記載の抗体、
- 〔９〕 抗AR1鎖抗体における下記（a）のアミノ酸配列からなる可変領域と、
- 25 抗AR2鎖抗体における下記（b 1）～（b 10）のいずれかに記載のアミノ酸配列からなる可変領域とを含む、〔８〕に記載の抗体、

- 8 -

- (a) H鎖可変領域が配列番号：1に記載のアミノ酸配列であり、L鎖可変領域が配列番号：2に記載のアミノ酸配列
- (b 1) H鎖可変領域が配列番号：7に記載のアミノ酸配列であり、L鎖可変領域が配列番号：8に記載のアミノ酸配列
- 5 (b 2) H鎖可変領域が配列番号：9に記載のアミノ酸配列であり、L鎖可変領域が配列番号：10に記載のアミノ酸配列
- (b 3) H鎖可変領域が配列番号：19に記載のアミノ酸配列であり、L鎖可変領域が配列番号：20に記載のアミノ酸配列
- (b 4) H鎖可変領域が配列番号：13に記載のアミノ酸配列であり、L鎖可変領域が配列番号：14に記載のアミノ酸配列
- 10 (b 5) H鎖可変領域が配列番号：23に記載のアミノ酸配列であり、L鎖可変領域が配列番号：24に記載のアミノ酸配列
- (b 6) H鎖可変領域が配列番号：5に記載のアミノ酸配列であり、L鎖可変領域が配列番号：6に記載のアミノ酸配列
- 15 (b 7) H鎖可変領域が配列番号：17に記載のアミノ酸配列であり、L鎖可変領域が配列番号：18に記載のアミノ酸配列
- (b 8) H鎖可変領域が配列番号：15に記載のアミノ酸配列であり、L鎖可変領域が配列番号：16に記載のアミノ酸配列
- (b 9) H鎖可変領域が配列番号：21に記載のアミノ酸配列であり、L鎖可変領域が配列番号：22に記載のアミノ酸配列
- 20 (b 10) H鎖可変領域が配列番号：11に記載のアミノ酸配列であり、L鎖可変領域が配列番号：12に記載のアミノ酸配列
- [10] 抗AR1鎖抗体における下記(a)のアミノ酸配列からなる可変領域と、抗AR2鎖抗体における下記(b 1)～(b 3)のいずれかに記載のアミノ酸配列からなる可変領域とを含む、[8]に記載の抗体、
- 25 (a) H鎖可変領域が配列番号：3に記載のアミノ酸配列であり、L鎖可

- 9 -

変領域が配列番号：4に記載のアミノ酸配列

(b 1) H鎖可変領域が配列番号：9に記載のアミノ酸配列であり、L鎖可変領域が配列番号：10に記載のアミノ酸配列

(b 2) H鎖可変領域が配列番号：9に記載のアミノ酸配列であり、L鎖可変領域が配列番号：10に記載のアミノ酸配列

(b 3) H鎖可変領域が配列番号：21に記載のアミノ酸配列であり、L鎖可変領域が配列番号：22に記載のアミノ酸配列

[1 1] [2] ~ [1 0] のいずれかに記載の抗体を有効成分として含有する医薬組成物、

10 [1 2] 酵素、および該酵素の基質の両方を認識する抗体であって、酵素活性を増強する補因子の機能を代替する二種特異性抗体、

[1 3] 酵素が蛋白質分解酵素である、[1 2] に記載の抗体、

[1 4] 蛋白質分解酵素が血液凝固線溶関連因子である、[1 3] に記載の抗体、

15 [1 5] 血液凝固第VIII因子および/または活性化血液凝固第VIII因子の作用を代替する作用を有する、[1 4] に記載の抗体、

[1 6] H鎖CDR3の配列が配列番号：42、46、50、54、58、62、66、70、74、78、もしくは82のいずれかに記載のアミノ酸配列からなる相補性決定領域、またはこれと機能的に同等の相補性決定領域を有する、[1 2] ~ [1 5] のいずれかに記載の抗体、

20 [1 7] XB12またはXT04のいずれかのH鎖CDR3のアミノ酸配列からなる相補性決定領域またはこれと機能的に同等の相補性決定領域を有し、且つ、H鎖CDR3の配列が配列番号：50、54、58、62、66、70、74、78もしくは82のいずれかに記載のアミノ酸配列からなる相補性決定領域、またはこれと機能的に同等の相補性決定領域を有する、[1 2] ~ [1 5] のいずれかに記載の抗体、

25

- 10 -

- 〔18〕 H鎖CDR配列が配列番号：40～42、44～46、48～50、52～54、56～58、60～62、64～66、68～70、72～74、76～78もしくは80～82のいずれかに記載のアミノ酸配列からなる相補性決定領域、またはこれと機能的に同等の相補性決定領域を有する、〔12〕～〔15〕のいずれかに記載の抗体、
- 5
- 〔19〕 H鎖配列がXB12もしくはXT04のいずれかのアミノ酸配列からなる相補性決定領域、またはこれと機能的に同等の相補性決定領域を有し、且つ、H鎖CDR配列が配列番号：48～50、52～54、56～58、60～62、64～66、68～70、72～74、76～78もしくは80～82のいずれかのアミノ酸配列からなる相補性決定領域、またはこれと機能的に同等の相補性決定領域を有する、〔12〕～〔15〕のいずれかに記載の抗体、
- 10
- 〔20〕 〔12〕～〔19〕のいずれかに記載の抗体および薬学的に許容される担体を含む組成物、
- 15
- 〔21〕 出血、出血を伴う疾患、もしくは出血に起因する疾患の予防および/または治療に用いられる医薬組成物である、〔20〕に記載の組成物、
- 〔22〕 出血、出血を伴う疾患、もしくは出血に起因する疾患が、血液凝固第VIII因子および/または活性化血液凝固第VIII因子の活性の低下ないし欠損によって発症および/または進展する疾患である、〔21〕に記載
- 20
- の医薬組成物、
- 〔23〕 第VIII因子の活性の低下ないしは欠損によって発症および/または進展する疾患が、血友病Aである、〔22〕に記載の医薬組成物、
- 〔24〕 血液凝固第VIII因子および/または活性化血液凝固第VIII因子の活性の低下ないし欠損によって発症および/または進展する疾患が、血液凝固第VIII因子および/または活性化血液凝固第VIII因子に対するインヒ
- 25
- ビターが出現している疾患である、〔22〕に記載の医薬組成物、

- 11 -

〔25〕 血液凝固第VIII因子および/または活性化血液凝固第VIII因子の活性の低下ないし欠損によって発症および/または進展する疾患が、後天性血友病である、〔22〕に記載の医薬組成物、

5 〔26〕 血液凝固第VIII因子および/または活性化血液凝固第VIII因子の活性の低下によって発症および/または進展する疾患が、フォンビルブランド病である、〔22〕に記載の医薬組成物、

〔27〕 〔12〕～〔19〕のいずれかに記載の抗体、または〔20〕～〔26〕のいずれかに記載の組成物を投与する工程を含む、出血、出血を伴う疾患、もしくは出血に起因する疾患を予防および/または治療する方法、

10

〔28〕 〔12〕～〔19〕のいずれかに記載の抗体の、〔20〕～〔26〕のいずれかに記載の組成物の製造のための使用、

〔29〕 少なくとも〔12〕～〔19〕のいずれかに記載の抗体、または〔20〕に記載の組成物を含む、〔27〕に記載の予防および/または治療

15

する方法に用いるためのキット、

を提供するものである。

本発明における二種特異性抗体（bispecific抗体）は、2種類の異なる抗原決定基に対して特異性を有する抗体のことである。

本発明の二種特異性抗体は、特に制限されないが、モノクローナル抗体であることが好ましい。また、遺伝子組換え技術を用いて産生させた組換え型抗体であることが好ましい。（例えば、Borrebaeck CAK and Larrick JW, THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, Published in the United Kingdom by MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990 参照）。組換え型抗体は、それをコードするDNAをハイブリドーマ、または抗体を産生する感作リンパ球等の抗体産生細胞からクローニングし、

20

25 適当なベクターに組み込んで、これを宿主に導入し産生させることにより得ることができる。

さらに、本発明における抗体は、その抗体断片や抗体修飾物であってよい。抗体断片としては、ダイアボディ (diabody ; Db)、線状抗体、一本鎖抗体 (以下、s cFvとも記載する) 分子などが含まれる。ここで、「Fv」断片は最小の抗体断片であり、完全な抗原認識部位と結合部位を含む。この領域は1つの重 (H) 鎖可変領域 (V_H) および軽 (L) 鎖可変領域 (V_L) が非共有結合により強く連結されたダイマー (V_H - V_L ダイマー) である。各可変領域の3つの相補鎖決定領域 (complementarity determining region ; CDR) が相互作用し、 V_H - V_L ダイマーの表面に抗原結合部位を形成する。6つのCDRが抗体に抗原結合部位を付与している。しかしながら、1つの可変領域 (または、抗原に特異的な3つのCDRのみを含むFvの半分) であっても、全結合部位よりも親和性は低いが、抗原を認識し、結合する能力を有する。

また、Fab断片 (F(ab)とも呼ばれる) はさらに、L鎖の定常領域およびH鎖の定常領域 (CH1) を含む。Fab'断片は、抗体のヒンジ領域からの1またはそれ以上のシステインを含むH鎖CH1領域のカルボキシ末端由来の数残基を付加的に有する点でFab断片と異なっている。Fab'-SHとは、定常領域の1またはそれ以上のシステイン残基が遊離のチオール基を有するFab'を示すものである。F(ab')断片は、F(ab')₂ペプシン消化物のヒンジ部のシステインにおけるジスルフィド結合の切断により製造される。化学的に結合されたその他の抗体断片も当業者には知られている。

ダイアボディは、遺伝子融合により構築された二価 (bivalent) の抗体断片を指す (Holliger P et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993)、EP404, 097号、W093/11161号等)。ダイアボディは、2本のポリペプチド鎖から構成されるダイマーであり、ポリペプチド鎖は各々、同じ鎖中でL鎖可変領域 (V_L) 及びH鎖可変領域 (V_H) が、互いに結合できない位に短い、例えば、5残基程度のリンカーにより結合されている。同一ポリペプチド鎖上にコードされる V_L と V_H とは、その間のリンカーが短いため単鎖可変領域フラグメントを形成することが出来ず二量

体を形成するため、ダイアボディは2つの抗原結合部位を有することとなる。

一本鎖抗体またはscFv抗体断片には、抗体の V_H および V_L 領域が含まれ、これらの領域は単一のポリペプチド鎖中に存在する。一般に、Fvポリペプチドはさらに V_H および V_L 領域の間にポリペプチドリンカーを含んでおり、これによりscFvは、

- 5 抗原結合のために必要な構造を形成することができる (scFvの総説については、Pluckthun『The Pharmacology of Monoclonal Antibodies』Vol. 113 (Rosenburg and Moore ed (Springer Verlag, New York) pp. 269-315, 1994) を参照)。本発明におけるリンカーは、その両端に連結された抗体可変領域の発現を阻害するものでなければ特に限定されない。
- 10 IgG タイプ二種特異性抗体は IgG 抗体を産生するハイブリドーマ二種を融合することによって生じる hybrid hybridoma (quadroma) によって分泌させることが出来る (Milstein C et al. Nature 1983, 305: 537-540)。また目的の二種の IgG を構成する L 鎖及び H 鎖の遺伝子、合計 4 種の遺伝子を細胞に導入することによって共発現させることによって分泌させることが出来る。この際 H 鎖の CH3
- 15 領域に適当なアミノ酸置換を施すことによって H 鎖についてヘテロな組合せの IgG を優先的に分泌させることも出来る (Ridgway JB et al. Protein Engineering 1996, 9: 617-621, Merchant AM et al. Nature Biotechnology 1998, 16: 677-681)。

- Fab' を化学的に架橋することによっても二種特異性抗体を作製し得る。例えば一方の抗体から調製した Fab' を *o*-PDM (*ortho*-phenylenedi-maleimide) にてマレイミド化し、これともう一方の抗体から調製した Fab' を反応させることにより、異なる抗体由来 Fab' 同士を架橋させ二種特異性 $F(ab')_2$ を作製することが出来る (Keler T et al. Cancer Research 1997, 57: 4008-4014)。また Fab' -チオニトロ安息香酸 (TNB) 誘導体と Fab' -チオール (SH) 等の抗体断片を化学的に結合する方法も知られている (Brennan M et al. Science 1985, 229: 81-83)。
- 25

- 14 -

化学架橋の代りに Fos, Jun などに由来するロイシンジッパーを用いることも出来る。Fos, Jun はホモダイマーも形成するが、ヘテロダイマーを優先的に形成することを利用する。Fos ロイシンジッパーを付加した Fab' と Jun のそれを付加したもう一方の Fab' を発現調製する。温和な条件で還元した単量体 Fab' -

5 Fos, Fab' -Jun を混合し反応させることによって二種特異性 $F(ab')_2$ が形成できる (Kostelny SA et al. J of Immunology, 1992, 148: 1547-53)。この方法は Fab' には限定されず、scFv, Fv などにおいても応用可能である。

ダイアボディにおいても二種特異性抗体を作製し得る。二種特異性ダイアボディは二つの cross-over scFv 断片のヘテロダイマーである。つまり二種の抗体

10 A, B 由来の V_H と V_L を 5 残基前後の比較的短いリンカーで結ぶことによって作製された $V_H(A)-V_L(B)$, $V_H(B)-V_L(A)$ を用いてヘテロダイマーを構成することによって出来る (Holliger P et al. Proc of the National Academy of Sciences of the USA 1993, 90: 6444-6448)。

この際、二種の scFv を 15 残基程度の柔軟な比較的長いリンカーで結ぶ(一本鎖ダイアボディ : Kipriyanov SM et al. J of Molecular Biology. 1999, 293: 41-56)、適当なアミノ酸置換 (knobs-into-holes: Zhu Z et al. Protein Science. 1997, 6: 781-788) を行なうことによって目的の構成を促進させることも出来る。

二種の scFv を 15 残基程度の柔軟な比較的長いリンカーで結ぶことによって作製できる $sc(Fv)_2$ も二種特異性抗体となり得る (Mallender WD et al. J of Biological Chemistry, 1994, 269: 199-206)。

20

抗体修飾物としては、例えば、ポリエチレングリコール (PEG) 等の各種分子と結合した抗体を挙げることができる。本発明の抗体修飾物においては、結合される物質は限定されない。このような抗体修飾物を得るには、得られた抗体に化学的な修飾を施すことによって得ることができる。これらの方法はこの分野において既に確立されている。

25

本発明の抗体は、ヒト抗体、マウス抗体、ラット抗体など、その由来は限定されない。またキメラ抗体やヒト化抗体などの遺伝子改変抗体でもよい。

ヒト抗体の取得方法は既に知られており、例えば、ヒト抗体遺伝子の全てのレパートリーを有するトランスジェニック動物を目的の抗原で免疫することで目的
5 のヒト抗体を取得することができる（国際特許出願公開番号WO 93/12227, WO 92 /03918, WO 94/02602, WO 94/25585, WO 96/34096, WO 96/33735参照）。

遺伝子改変抗体は、既知の方法を用いて製造することができる。具体的には、たとえばキメラ抗体は、免疫動物の抗体のH鎖、およびL鎖の可変領域と、ヒト抗体のH鎖およびL鎖の定常領域からなる抗体である。免疫動物由来の抗体の可変領域をコードするDNAを、ヒト抗体の定常領域をコードするDNAと連結し、これを発
10 現ベクターに組み込んで宿主に導入し産生させることによって、キメラ抗体を得ることができる。

ヒト化抗体は、再構成（reshaped）ヒト抗体とも称される改変抗体である。ヒト化抗体は、免疫動物由来の抗体のCDRを、ヒト抗体の相補性決定領域へ移植することによって構築される。その一般的な遺伝子組換え手法も知られている。
15

具体的には、マウス抗体のCDRとヒト抗体のフレームワーク領域（framework region ; FR）を連結するように設計したDNA配列を、末端部にオーバーラップする部分を有するように作製した数個のオリゴヌクレオチドからPCR法により合成する。得られたDNAを、ヒト抗体定常領域をコードするDNAと連結し、次いで発現ベ
20 クターに組み込んで、これを宿主に導入し産生させることにより得られる（欧州特許出願公開番号EP 239400、国際特許出願公開番号WO 96/02576参照）。CDRを介して連結されるヒト抗体のFRは、相補性決定領域が良好な抗原結合部位を形成するものが選択される。必要に応じ、再構成ヒト抗体の相補性決定領域が適切な抗原結合部位を形成するように抗体の可変領域におけるフレームワーク領域のア
25 ミノ酸を置換してもよい（Sato K et al, Cancer Research 1993, 53: 851-856）。また、様々なヒト抗体由来のフレームワーク領域に置換してもよい（国際

特許出願公開番号W0 99/51743参照)。

本発明は、機能蛋白質の代替機能を有する二種特異性抗体、より好ましくは機能蛋白質の代替機能を有する二種特異性抗体を提供する。本発明の抗体の好ましい態様としては、ヘテロ分子を含む受容体に対してリガンド機能代替活性を有する抗体である。

本発明においてヘテロ分子を含む受容体とは、受容体（多量体）が異なる2つ以上の蛋白質（受容体分子）で構成されているものをいう。多量体は二量体、三量体、四量体など、その蛋白質（受容体分子）数により限定はされないが、好ましくは二量体である。例えば、受容体が二量体の場合には、ヘテロ受容体は2つの構成蛋白質（受容体分子）が同一でないことを表す。

リガンド機能代替活性を有する抗体とは、ある受容体に対して、アゴニスト作用を有する抗体を指す。一般的に、アゴニストであるリガンドが受容体と結合すると、受容体蛋白質の立体構造が変化し、受容体が活性化（受容体が膜蛋白質である場合には、通常、細胞増殖などのシグナルを発する）される。二量体を形成するタイプの受容体である場合には、リガンド機能代替抗体は適切な距離、角度で受容体を二量体化させることにより、リガンドと同様の働きをすることができる。つまり、適当な抗受容体抗体はリガンドにより受容体の二量体化を模倣でき、リガンド機能代替抗体となり得る。

本発明の好ましい態様においては、本発明の受容体としてサイトカインヘテロ受容体を挙げることができる。

サイトカインは、通常、各種の血球細胞の増殖と分化を制御する生理活性蛋白質の総称として用いられるが、非免疫系細胞を含む細胞の増殖因子及び増殖抑制因子を指すこともある。従って、サイトカインは細胞から放出され、免疫、炎症反応の制御作用、抗ウイルス作用、抗腫瘍作用、細胞増殖・分化の調節作用など細胞間相互作用を媒介する蛋白質性因子の総称である。

本発明でいうヘテロ受容体に作用するサイトカインの具体的な例としては、

インターロイキン2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 15、コロニー刺激因子 (GM-CSFなど)、インターフェロン (IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ など)、CNTF、LIF、Oncostatin M、CT-1などを挙げることができるが、好ましくはインターフェロンであり、特に好ましくはI型インターフェロンである。

- 5 インターフェロンにはIFN- α 、IFN- β 、IFN- γ 、IFN- τ などが含まれる。IFN- α とIFN- β は相同性が高い為、これら2つのIFNは同一のレセプターを介して反応することができる。又、IFN- α 、IFN- β ならびにIFN- τ はI型インターフェロンに分類される。

- I型インターフェロン受容体の例として、AR1鎖 (GenBank ACCESSION No : J03171、文献: Uze G et al. Cell 1990, 60: 225-34) およびAR2鎖 (GenBank ACCESSION No : U29584、文献: Domanski P et al. J of Biological Chemistry 1995, 270: 21606-11、LutfaUa G et al. EMBO J 1995, 14: 5100-8) を有する受容体を挙げることができる。

- 15 本発明のリガンド機能代替二種特異性抗体を得る方法は特に制限されず、どのような方法で取得されてもよい。例えば、二種の受容体分子 (A鎖, B鎖) からなるヘテロ受容体に対するリガンド機能代替二種特異性抗体を得る場合、抗A鎖抗体及び抗B鎖抗体を取得する。その後、抗A鎖抗体のH鎖とL鎖及び抗B鎖抗体のH鎖とL鎖を含む二種特異性抗体を作製する。ここで、抗A鎖抗体と抗B鎖抗体はそれぞれ複数種得られていることが望ましく、これらを用いてなるべく多くの組合せの二種特異性抗体を作製することが好ましい。二種特異性抗体を作製後、リガンド機能代替活性を有する抗体を選択する。二種特異性抗体の作製は、それぞれの抗体産生ハイブリドーマ同士の融合、もしくは抗体発現ベクターの細胞導入など、公知の方法により行うことができる。

- 25 受容体に対する抗体は、当業者に公知の方法により得ることができる。例えば、免疫動物に対して抗原を免疫することにより調製することができる。動物を免疫する抗原としては、免疫原性を有する完全抗原と、免疫原性を有さない不完全抗

- 18 -

原（ハプテンを含む）が挙げられる。本発明においては、本発明のリガンド機能代替抗体がリガンドとして作用すると考えられる受容体を、上記抗原（免疫原）として使用する。本発明における上記受容体は特に制限されないが、好ましくはヘテロ二量体である。免疫化する動物として、例えば、マウス、ハムスター、またはアカゲザル等を用いることができる。これら動物に対して、抗原を免疫化することは、当業者においては、周知の方法によって行うことができる。本発明において好ましくは、免疫化された動物または該動物の細胞から抗体のL鎖およびH鎖の可変領域の回収を行う。この操作は、当業者においては一般的に公知の技術を用いて行うことができる。抗原によって免疫化された動物は、とりわけ脾臓細胞において該抗原に対する抗体を発現する。従って、例えば、免疫化された動物の脾臓細胞からmRNAを調製し、該動物の可変領域に対応するプライマーを用いて、RT-PCRによりL鎖およびH鎖の可変領域の回収を行うことができる。

詳細には、動物に受容体のA鎖、B鎖それぞれを免疫する。免疫原とする受容体は、該受容体を構成する蛋白質全体、もしくは該蛋白質の部分ペプチドであってもよい。また、動物を免疫するのに用いる免疫原としては、場合により抗原となるものを他の分子に結合させ可溶性抗原とすることも可能であり、また、場合によりそれらの断片を用いてもよい。受容体のような膜貫通分子を抗原として用いる場合、これらの断片（例えば、受容体の細胞外領域）を用いるのが好ましい。また、膜貫通分子を細胞表面上に発現する細胞を免疫原とすることもできる。このような細胞は天然（腫瘍セルライン等）由来の細胞、または、組換え技術により膜貫通分子を発現するように構成された細胞であってもよい。この動物の脾細胞からmRNAを抽出し、可変領域付近に対応するプライマーを用いてRT-PCRにてL鎖、H鎖可変領域のcDNAを回収する。CDRに対応するプライマー、CDRよりも多様性の低いフレームワークに対応するプライマー、あるいはシグナル配列とCH1もしくはL鎖定常領域（C_L）に対応するプライマーを用いることができる。また、in vitroにおいてリンパ球を免疫化することもできる。これを用いてscFvもしくはFabを

提示するライブラリーを構築する。パンニングによって抗原結合抗体クローンを濃縮・クローン化し、その可変領域を用いて抗体発現ベクターを作製する。抗A鎖抗体発現ベクターと抗B鎖抗体発現ベクターを同一の細胞に導入し、抗体を発現させることにより二種特異性抗体を得ることができる。この際、ヒトや免疫し

- 5 していない動物の末梢血単核球、脾臓、扁桃腺などに由来するmRNAを材料とする同様のライブラリーを用いてスクリーニングを行うことも可能である。

リガンド機能代替活性を有する抗体の選択は、例えば、以下のような方法により行うことができる。

- (1) リガンド依存的に増殖する細胞の培養時に抗体を添加することによって、
10 リガンド同様に細胞が増殖するか否かを指標とする。細胞が増殖する場合に、被験多種特異性抗体は、リガンド機能代替作用を有するものと判定する。
- (2) リガンドの本来の活性（増殖とは限らない）を示す細胞株の培養時に加えることによって、リガンド同様の反応を示すか否かを指標とする。リガ
15 ンド同様の反応を示す場合に、抗体は、リガンド機能代替作用を有するものと判定する。

上記細胞は、通常、抗体がアゴニストとして作用し得るヘテロ受容体を細胞表面に発現しており、該受容体はリガンドと結合することによりシグナルを発する。上記方法において使用する細胞は、受容体のリガンド依存的に増殖できる細胞

- 20 (リガンド依存性増殖細胞)であることが好ましい。また、上記受容体は、通常、リガンドと結合することにより、細胞増殖シグナルを発するものであることが好ましい。しかし、上記受容体が細胞増殖シグナルを出さないものである場合、該受容体を、細胞増殖シグナルを発するタイプの受容体と融合させ、所謂キメラ受容体とすることにより、上記方法に使用することができる。該キメラ受容体は、
25 リガンドと結合することにより、細胞増殖シグナルを発する。受容体と融合させることによりキメラ受容体を構築するのに適した受容体は、細胞増殖シグナルを

発するタイプの受容体であれば特に制限されないが、通常、膜蛋白質であり、より好ましくは細胞外領域がリガンド結合機能を有する受容体断片であり、細胞内領域がシグナル伝達機能を有する受容体断片であるような受容体である。細胞内領域に用いる受容体は、具体的にGH受容体、G-CSF受容体、MPL、EPO受容体、c-

- 5 Kit、Flt-3、IL-2受容体、IL-3受容体、IL-5受容体、GM-CSF受容体等を挙げることができる。本発明における上記リガンド依存性増殖細胞の好適な例として、具体的には、細胞外領域がリガンド受容体断片であり細胞内領域がG-CSF受容体断片であるキメラ受容体を発現せたりリガンド依存性増殖細胞Ba/F3を示すことができる。その他、上記方法において使用できる細胞として、例えば、NFS60、
- 10 FDC-P1、FDC-P2、CTLL-2、DA-1、KT-3等を挙げることができる。

得られた抗体は、均一にまで精製することができる。抗体の分離、精製は通常の蛋白質で使用されている分離、精製方法を使用すればよい。例えばアフィニティークロマトグラフィー等のクロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、透析、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動等を適宜選

- 15 択、組み合わせれば、抗体を分離、精製することができる (Antibodies : A Laboratory Manual, Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988) が、これらに限定されるものではない。アフィニティークロマトグラフィーに用いるカラムとしては、プロテインAカラム、プロテインGカラムなどが挙げられる。

- 20 本発明の抗体は、例えば、AR1鎖およびAR2鎖を含むI型インターフェロン受容体に対して、リガンド機能代替活性を有する抗体である場合には、好ましくは、抗AR1鎖抗体における可変領域と、抗AR2鎖抗体における可変領域とを含む構造を有する。インターフェロン機能代替抗体は以下の方法で作製した。I型インターフェロン受容体の受容体分子AR1鎖及びAR2鎖それぞれの細胞外領域とG-CSF受容
- 25 体の細胞内領域のキメラ受容体をそれぞれ発現するIL-3依存性マウスプロB細胞株Ba/F3を樹立した。それぞれの細胞をBALB/cの腹腔に免疫した。

抗体価の上昇した免疫マウスの脾臓よりpolyA (+) RNAを抽出し、RT-PCRにてscFvを合成し、scFv提示ファージライブラリーを構築した。AR1鎖発現Ba/F3免疫マウス脾臓由来のファージライブラリーとビオチン化可溶型AR1鎖を混合後ストレプトアビジン磁気ビーズで捕捉するパンニング法にて、結合ファージを濃縮した。可溶型AR1鎖を用いたファージELISAにて抗AR1鎖抗体提示ファージを選択した。また同様に可溶型AR2鎖及びAR2鎖発現Ba/F3免疫マウス脾臓由来のライブラリーファージを用いて抗AR2鎖抗体ファージを選択した。抗体の特異性に最も関与するといわれているH鎖のCDR3のアミノ酸配列が異なる抗体を選択した。

scFvを動物細胞用のシグナル配列とCH1-hinge-CH2-CH3の間に挿入し、scFv-CH1-Fc発現ベクターを作製した。AR1鎖に対する抗体とAR2鎖に対する抗体を様々な組合せで細胞に導入し、二種特異性抗体を発現させた。

BaF3-ARGは、Ba/F3にAR1鎖及びAR2鎖のそれぞれの細胞外領域とG-CSF受容体の細胞内領域とのキメラ分子の発現ベクターを導入して樹立した。この細胞はIFN- α に依存して増殖した。BaF3-ARGの増殖を支持できる抗体の組合せの二種特異性抗体を選択した。

Daudi細胞はIFN- α による細胞増殖抑制活性について高感受性なヒトB細胞株である。先に選択された二種特異性抗体をDaudi細胞に加え、IFN- α と同様に増殖を阻害することを確認した。該抗体としては、特に制限されるものではないが、例えば、抗AR1鎖抗体の下記のいずれかの可変領域と、抗AR2鎖抗体の下記のいずれかの可変領域とを含む抗体を挙げることができる。

・抗AR1鎖抗体の可変領域： AR1-41、AR1-24

・抗AR2鎖抗体の可変領域： AR2-37、AR2-11、AR2-13、AR2-45、AR2-22、AR2-43、AR2-40、AR2-14、AR2-44、AR2-33、AR2-31

上記のそれぞれの可変領域のV_HおよびV_Lのアミノ酸配列を、配列番号：1～26に示す（各可変領域のV_HおよびV_Lと、配列番号との関係を表1に示す）。

- 22 -

表 1

	可変領域	配列番号	
		V _H	V _L
5			
	AR1-41	1	2
	AR1-24	3	4
	AR2-37	5	6
10	AR2-11	7	8
	AR2-13	9	10
	AR2-45	11	12
	AR2-22	13	14
	AR2-43	15	16
15	AR2-40	17	18
	AR2-14	19	20
	AR2-44	21	22
	AR2-33	23	24
	AR2-31	25	26
20			

抗AR1鎖抗体がAR1-24の場合、パートナーとなる抗AR2鎖抗体は、AR2-13、AR2-31、あるいはAR2-44であることが好ましく、抗AR1鎖抗体がAR1-41の場合、パートナーとなる抗AR2鎖抗体は、AR2-11、AR2-13、AR2-14、AR2-22、AR2-33、AR2-37、AR2-40、AR2-43、AR2-44、あるいはAR2-45であることが好ましい。AR2-13およびAR2-44は、AR1-41およびAR1-24の両方の抗体に対してパートナーとなること

が可能である。上記のような対を形成する抗体もまた、本発明に含まれる。

また本発明の機能蛋白質の代替機能を有する二種特異性抗体の好ましい態様としては、酵素および該酵素の基質の両方を認識するような補因子の機能を代替する二種特異性抗体である。

5 本発明における補因子は、酵素に作用し酵素反応を増強し得るものであれば特に制限されない。本発明における補因子としては、例えば、蛋白質分解酵素の補因子を挙げることができる。蛋白質分解酵素の補因子の具体例としては、血液凝固線溶関連因子における補因子（F. VIII/F. VIIIa、PZ、TM、TM/PSシステム）や補体反応の補因子（C4b、MCP、CR1、H因子）等を挙げることができる。

10 本発明における酵素、および該酵素の基質、および該酵素の補因子の具体例としては、例えば、以下の組合せを挙げることができる。

(a) 血液凝固線溶関連因子における補因子の例 1

酵素：F. IXa

基質：F. X

15 補因子：F. VIII/F. VIIIa

補因子F. VIIIaは、F. IXaとF. Xの両方に結合することによって、F. IXaによるF. Xの活性化を増強する。上記の酵素F. IXa、基質F. Xの両方を認識する二種特異性抗体の中には、F. Xの活性化を増強する作用を有するものがある。このような抗体の中には、補因子F. VIII/F. VIIIaの作用機能を代替する作用を有するものが
20 存在すると考えられる。

(b) 血液凝固線溶関連因子における補因子の例 2

酵素：ZPI

基質：F. X/F. Xa

補因子：PZ

25 補因子PZは、serpinファミリーのZPIとF. Xaに結合することで、ZPIによるF. Xa阻害活性を増強する。すなわち、ZPIとF. X/F. Xaの両方を認識する二種特異性抗

体の中には、PZの機能を代替する作用を有するものが存在すると考えられる。

(C) 血液凝固線溶関連因子における補因子の例 3

酵素：トロンビン

基質：TAFI

5 補因子：TM

補因子TMは、トロンビンによるTAFIの活性化を増強する。すなわち、トロンビンとTAFIの両方を認識する二種特異性抗体の中には、TMの機能を代替する作用を有するものが存在すると考えられる。

(d) 血液凝固線溶関連因子における補因子の例 4

10 酵素：トロンビン

基質：PC

補因子：TM/PS

TM/PSシステムは、トロンビンによるPCの活性化を増強する。すなわち、トロンビンとPCの両方を認識する二種特異性抗体の中には、TM/PSシステムの機能を代替するものが存在すると考えられる。

15

(e) 補体反応の補因子の例 1

酵素：C1s

基質：C2

補因子：C4b

20 C4bはC1sによるC2の分解促進作用を有する。すなわちC1sとC2の両方を認識する二種特異性抗体の中には、C4bの機能を代替するものが存在すると考えられる。

(f) 補体反応の補因子の例 2

酵素：補体制御タンパクI因子 (Complement Regulatory Factor I)

基質：C3b

25 補因子：補体制御タンパクH因子 (Complement Regulatory Factor H)

Membrane Cofactor Protein (MCP)

Complement Receptor 1 (CR1)

Complement Regulatory Factor H、MCP、CR1は、Complement Regulatory Factor IによるC3b分解促進作用を有する。すなわち、Complement Regulatory Factor IとC3bの両方を認識する二種特異性抗体の中には、Complement

5 Regulatory Factor H、MCP、CR1の機能を代替するものが存在すると考えられる。

上記補因子の中で、特に好ましいのはF. VIII/F. VIIIaである。F. VIII/F. VIIIaは、トロンビン等の蛋白分解酵素により限定分解を受けるが、F. VIII/F. VIIIaの補因子活性を有している限り、その形態は問わない。また、変異F. VIII/F. VIIIaや、遺伝子組換え技術により人為的に改変したF. VIII/F. VIIIaに関しても、

10 F. VIII/F. VIIIaの補因子活性を有している限り、F. VIII/F. VIIIaに含まれる。

本発明の補因子機能代替二種特異性抗体を得る方法は特に制限されず、どのような方法で取得されてもよい。例えば、酵素A及び基質Bに対する補因子機能代替二種特異性抗体を得る場合、酵素A、基質Bそれぞれを免疫動物に免疫し、抗酵素A抗体及び抗基質B抗体を取得する。その後、抗酵素A抗体のH鎖とL鎖及び抗基質B

15 抗体のH鎖とL鎖を含む二種特異性抗体を作製する。ここで、抗酵素A抗体と抗基質B抗体はそれぞれ複数種得られていることが望ましく、これらを用いてなるべく多くの組合せの二種特異性抗体を作製することが好ましい。二種特異性抗体を作製後、補因子機能代替活性を有する抗体を選択する。

酵素あるいは基質に対する抗体は、当業者に公知の方法により得ることができる。例えば、免疫動物に対して抗原を免疫することにより調製することができる。動物を免疫する抗原としては、免疫原性を有する完全抗原と、免疫原性を有さない不完全抗原（ハプテンを含む）が挙げられる。本発明においては、本発明の補因子機能代替抗体が補因子として作用すると考えられる酵素あるいは基質を、上記抗原（免疫原）として使用する。免疫する動物として、例えば、マウス、ハム

25 スター、またはアカゲザル等を用いることができる。これら動物に対して、抗原を免疫することは、当業者においては、周知の方法によって行うことができる。

本発明において好ましくは、免疫された動物または該動物の細胞から抗体のL鎖およびH鎖の可変領域の回収を行う。この操作は、当業者においては一般的に公知の技術を用いて行うことができる。抗原によって免疫された動物は、とりわけ脾臓細胞において該抗原に対する抗体を発現する。従って、例えば、免疫された動物の脾臓細胞からmRNAを調製し、該動物の可変領域に対応するプライマーを用いて、RT-PCRによりL鎖およびH鎖の可変領域の回収を行うことができる。

詳細には、動物に酵素、基質それぞれを免疫する。免疫原とする酵素、基質は、蛋白質全体、もしくは該蛋白質の部分ペプチドであってもよい。また、動物を免疫するのに用いる免疫原としては、場合により抗原となるものを他の分子に結合させ可溶性抗原とすることも可能であり、また、場合によりそれらの断片を用いてもよい。

この免疫された動物の脾細胞からmRNAを抽出し、可変領域付近に対応するプライマーを用いてRT-PCRにてL鎖、H鎖可変領域のcDNAを回収する。CDRに対応するプライマー、CDRよりも多様性の低いフレームワークに対応するプライマー、あるいはシグナル配列とCH1もしくはL鎖定常領域 (C_L) に対応するプライマーを用いることができる。また、*in vitro*においてリンパ球を免疫することもできる。これを用いてscFvもしくはFabを提示するライブラリーを構築する。パンニングによって抗原結合抗体クローンを濃縮・クローン化し、その可変領域を用いて抗体発現ベクターを作製する。抗酵素抗体発現ベクターと抗基質抗体発現ベクターを同一の細胞に導入し、抗体を発現させることにより二種特異性抗体を得ることができる。この際、ヒトや免疫していない動物の末梢血単核球、脾臓、扁桃腺などに由来するmRNAを材料とする同様のライブラリーを用いてスクリーニングを行うことも可能である。

補因子機能代替活性を有する抗体の選択は、例えば、以下のような方法により行うことができる。

(1) 該酵素・該基質を含む反応系を用い、該抗体を加えることによる該酵素活

性（基質分解能）の上昇を指標とし、選択する。

（２）該酵素・該基質・該補因子が関わる生体機能を測定するあるいは模倣する系（例えば、血漿凝固測定系）を用い、該補因子非存在条件下にて該抗体を加えることによる機能回復活性を指標とし、選択する。

- 5 得られた抗体は、均一にまで精製することができる。抗体の分離、精製は通常の蛋白質で使用されている分離、精製方法を使用すればよい。例えばアフィニティークロマトグラフィー等のクロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、透析、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動等を適宜選択、組合せれば、抗体を分離、精製することができる (Antibodies : A Laboratory Manual. Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988) が、これらに限定されるものではない。アフィニティークロマトグラフィーに用いるカラムとしては、プロテインAカラム、プロテインGカラムなどが挙げられる。

- 15 本発明の二種特異性抗体は、例えば代替する補因子がF. VIII/F. VIIIaである場合、すなわち酵素および基質の組合せが、血液凝固線溶関連因子のF. IXa、及びF. Xである場合には、好ましくは、抗F. IXa抗体における可変領域と、抗F. X抗体における可変領域とを含む構造を有する。

- 20 本発明のF. VIII/F. VIIIa機能代替二種特異性抗体は以下の方法で作製した。市販のF. IXa及びF. Xをそれぞれマウスの皮下に免疫した。抗体価の上昇した免疫マウスの脾臓から脾細胞を単離し、マウスミエローマ細胞と融合し、ハイブリドーマを作製した。抗原（F. IXa、F. X）に結合するハイブリドーマをそれぞれ選択し、可変領域に対応するプライマーを用いてRT-PCRにてL鎖、H鎖の可変領域を回収した。L鎖可変領域をCLを含むL鎖発現ベクターに、H鎖可変領域をH鎖定常領域を含むH鎖発現ベクターにそれぞれ組み込んだ。

- 25 抗F. IXa抗体（H鎖、L鎖）の発現ベクターとF. X抗体（H鎖、L鎖）の発現ベクターを同一の細胞に導入し、抗体を発現させることにより二種特異性抗体を得た。

得られた二種特異性抗体に関しては、F. XIa (F. IX活性化酵素)、F. IX (F. X活性化酵素)、F. X、F. Xaの合成基質 (S-2222)、リン脂質から成る測定系で、F. VIII/F. VIIIa (F. IXaによるF. X活性化の補因子) を代替する活性を評価した。その結果を以って、F. VIII/F. VIIIa代替活性を有する二種特異性抗体を選択した。

- 5 上記で選択された二種特異性抗体に関しては、F. VIII欠乏ヒト血漿を用いた凝固測定系 (APTT) を用い、凝固回復能を測定した。その結果、F. VIII欠乏ヒト血漿に対し、凝固回復能を有する二種特異性抗体を得たことを確認した。

本発明の抗体のH鎖CDR3は、特に制限されないが、具体的には、H鎖CDR3の配列が配列番号：42、46、50、54、58、62、66、70、74、78もしくは82のいずれかに記載のアミノ酸配列からなる相補性決定領域、またはこれと機能的に同等の相補性決定領域を挙げることができる。

また、本発明の上記抗体は、例えば、後述の実施例に記載のXB12またはXT04のいずれかのH鎖CDR3のアミノ酸配列からなる相補性決定領域、またはこれと機能的に同等の相補性決定領域を有し、且つ、H鎖CDR3の配列が配列番号：50、54、58、62、66、70、74、78もしくは82のいずれかに記載のアミノ酸配列からなる相補性決定領域またはこれと機能的に同等の相補性決定領域を有する。

さらに、本発明の上記抗体は具体例としては、H鎖CDR配列が配列番号：40～42、44～46、48～50、52～54、56～58、60～62、64～66、68～70、72～74、76～78もしくは80～82のいずれかに記載のアミノ酸配列からなる相補性決定領域、またはこれと機能的に同等の相補性決定領域を有する抗体を挙げることができる。また本発明の上記抗体の一例として、H鎖配列がXB12もしくはXT04のいずれかのアミノ酸配列からなる相補性決定領域、またはこれと機能的に同等の相補性決定領域を有し、且つ、H鎖CDR配列が配列番号：48～50、52～54、56～58、60～62、64～66、68～70、72～74、76～78もしくは80～82のいずれかのアミノ酸配

- 29 -

列からなる相補性決定領域、またはこれと機能的に同等の相補性決定領域を有する抗体を好適に示すことができる。

本発明で開示されている可変領域を用いて全長抗体を作製する場合、定常領域は特に限定されず、当業者に公知の定常領域を用いることが可能であり、例えば、

- 5 Sequences of proteins of immunological interest, (1991), U. S. Department of Health and Human Services. Public Health Service National Institutes of Healthや、An efficient route to human bispecific IgG, (1998). Nature Biotechnology vol. 16, 677-681、等に記載されている定常領域を用いることができる。

- 10 本発明の抗体の一つの態様としてはリガンド機能代替作用を有することから、本発明の抗体は、該抗体が作用する受容体の活性（機能）低下に起因する疾病に対して、有効な薬剤となることが期待される。

本発明の抗体の代替するリガンド機能が IFN- α/β である場合には、上記疾患として、例えば、ウィルス感染に起因する疾患を挙げることができる。これら疾

- 15 患は、例えば、ウィルス感染により宿主の免疫反応が活性化して炎症が慢性化する疾患であり、より具体的には、慢性C型肝炎を例示することができる。

慢性C型肝炎はC型肝炎ウィルス感染を原因とする慢性炎症疾患であり、ウィルス感染細胞に対する宿主の免疫反応が肝臓における炎症を引き起こす。症状の進行に伴い、徐々に肝機能は低下し、肝硬変を経て、末期には肝臓癌に至る。

- 20 慢性C型肝炎患者においては、C型肝炎ウィルスを排除するため、インターフェロン- α/β による治療が行われているが、血中半減期が短いことから連日投与が必要なため、患者の負担は相当に重い。従って、インターフェロン- α/β の作用を有し、持続性に優れた薬剤が求められていた。

- 25 また、ウィルス感染に起因する別の疾患として、慢性骨髄性白血病が挙げられる。

また、本発明における抗体の別の態様としては、補因子の機能を代替する作用

- 30 -

を有することから、本発明の抗体は、該補因子の活性（機能）低下に起因する疾病に対して、有効な薬剤となることが期待される。本発明の抗体の代替する補因子が血液凝固線溶関連因子である場合には、上記疾病として、例えば、出血、出血を伴う疾患、もしくは出血に起因する疾患等を挙げることができる。特に、F.

5 VIII/F. VIIIa、F. IX/F. IXa、F. XI/F. XIaの機能低下や欠損は、血友病と呼ばれる出血異常症を引き起こすことで知られる。

血友病のうち、先天性なF. VIII/F. VIIIa機能低下または欠損による出血異常症は、血友病Aと呼ばれる。血友病A患者が出血した場合、F. VIII製剤の補充療法が行われる。また、激しい運動や遠足の当日、頻回に関節内出血を来たす場合、あ
10 るいは重症血友病に分類される場合には、F. VIII製剤の予防投与が行われることがある（非特許文献2および3参照）。このF. VIII製剤の予防投与は、血友病A患者の出血エピソードを激減させるため、近年、大きく普及しつつある。出血エピソードを減らすことは、致死性及び非致死性の出血の危険及びそれに伴う苦痛を低下させるだけでなく、頻回の関節内出血に起因する血友病性関節障害を未然
15 に防ぐ。その結果、血友病A患者のQOL向上に大きく寄与する。

F. VIII製剤の血中半減期は短く、約12 ～ 16時間程度である。それ故、継続的な予防のためには、F. VIII製剤を週に3回程度投与する必要がある。これは、F. VIII活性として、概ね1%以上を維持することに相当する（非特許文献4および5参照）。また、出血時の補充療法においても、出血が軽度な場合を除き、再出
20 血を防ぎ、完全な止血を行うため、一定期間、F. VIII製剤を定期的に追加投与する必要がある。

また、F. VIII製剤は、静脈内に投与される。静脈内投与実施には、技術的な困難さが存在する。特に年少の患者に対する投与においては、投与に用いられる静脈が細い故、困難さが一層増す。

25 前述の、F. VIII製剤の予防投与や、出血の際の緊急投与においては、多くの場合、家庭療法・自己注射が用いられる。頻回投与の必要性和、投与の際の技術的

困難さは、投与に際し患者に苦痛を与えるだけでなく、家庭療法・自己注射の普及を妨げる要因となっている。

従って、現存の血液凝固第VIII因子製剤に比し、投与間隔が広い薬剤、あるいは投与が簡単な薬剤が、強く求められていた。

- 5 さらに、血友病A患者、特に重症血友病A患者には、インヒビターと呼ばれるF. VIIIに対する抗体が発生する場合がある。インヒビターが発生すると、F. VIII製剤の効果がインヒビターにより妨げられる。その結果、患者に対する止血管理が非常に困難になる。

- 10 このような血友病Aインヒビター患者が出血を来した場合は、通常、大量のF. VIII製剤を用いる中和療法か、複合体製剤 (complex concentrate) あるいはF. VIIa製剤を用いるバイパス療法が、実施される。しかしながら、中和療法では、大量のF. VIII製剤の投与が、逆に、インヒビター (抗F. VIII抗体) 力価を上げてしまう場合がある。また、バイパス療法では、複合体製剤やF. VIIa製剤の短血中半減期 (約2 ~ 8時間) が問題となっている。その上、それらの作用機序が、
- 15 F. VIII/F. VIIaの機能、すなわちF. IXaによるF. X活性化を触媒する機能に非依存であるため、場合によっては、止血機構をうまく機能させられず、不応答になってしまうケースがある。そのため、血友病Aインヒビター患者では、非インヒビター血友病A患者の出血に比し、十分な止血効果を得られない場合が多いのである。

- 20 従って、インヒビターの存在に左右されず、且つF. VIII/F. VIIaの機能を代替する薬剤が、強く求められていた。

- ところで、F. VIII/F. VIIaに関係する出血異常症として、血友病、抗F. VIII自己抗体を有する後天性血友病のほかに、vWFの機能異常または欠損に起因するフォンビルブランド病が知られている。vWFは、血小板が、血管壁の損傷部位の内
- 25 皮下組織に正常に粘着するのに必要であるだけでなく、F. VIIIと複合体を形成し、血漿中F. VIIIレベルを正常に保つのに必要である。フォンビルブランド病患者

- 32 -

では、これらの機能が低下し、止血機能異常を来している。

さて、(i) 投与間隔が広く、(ii) 投与が簡単であり、(iii) インヒビターの存在に左右されず、(iv) F. VIII/F. VIIIa非依存的にその機能を代替する医薬品の創製には、抗体を利用する方法が考えられる。抗体の血中半減期は、一般に、比較的
5 長く、数日から数週間である。また、抗体は、一般に、皮下投与後に血中に移行することが知られている。すなわち、抗体医薬品は、上記の (i)、(ii) を満たしている。

本発明における機能蛋白質の他の態様として、2種の異なる生理作用を有する蛋白に結合して、異なる複数の生理作用を制御する蛋白が挙げられる。その好適な
10 例としては、補体第四成分C4bおよびprotein S (PS) に結合するC4b binding protein (C4bp) が挙げられる。C4bpは、C4b-C2b複合体からC2bを解離させると共に、PSのaPC cofactor活性を消失させる作用を有する。従ってC4bpは補体系と血液凝固系に対して制御作用を示す。C4bおよびPSに対する二種特異性抗体は、C4bpの作用を代替する作用を有すると考えられる。また、C4bpはI因子によるC4b
15 の分解に対する補因子としての作用も有する。従って、I因子およびC4bに対する二種特異性抗体も、C4bpの作用を代替する作用を有すると考えられる。

本発明では、本発明の抗体を有効成分として含有する医薬組成物を提供する。
例えば、本発明の抗体がサイトカイン受容体に対してIFNの機能代替活性を有す
20 る抗体である場合には、該抗体はサイトカイン様作用を有するものと考えられる。従って該抗体は抗ウイルス作用、抗腫瘍作用、細胞増殖・分化調節作用を有する医薬品（医薬組成物）もしくは薬剤となることが期待される。一方で、IL-2の機能を代替する抗体はT細胞やNK細胞の分化・活性化による免疫賦活・抗腫瘍作用を有する医薬品（医薬組成物）もしくは薬剤、IL-3の機能を代替する抗体は造血
25 前駆細胞を増殖することによる血球回復促進作用を有する医薬品（医薬組成物）もしくは薬剤、IL-4の機能を代替する抗体はTh2（体液性免疫）への誘導による

- 抗アレルギー作用を有する医薬品（医薬組成物）もしくは薬剤、IL-5の機能を代替する抗体はB細胞・好酸球の増殖・分化誘導による免疫賦活・抗腫瘍作用を有する医薬品（医薬組成物）もしくは薬剤、IL-6の機能を代替する抗体は血小板産生刺激作用を有する医薬品（医薬組成物）もしくは薬剤、IL-7の機能を代替する
- 5 抗体はT細胞・B細胞の増殖による免疫賦活・抗腫瘍作用を有する医薬品（医薬組成物）もしくは薬剤、IL-9の機能を代替する抗体は肥満細胞の増殖・造血による血球回復促進作用を有する医薬品（医薬組成物）もしくは薬剤、IL-10の機能を代替する抗体は免疫抑制作用を有する医薬品（医薬組成物）もしくは薬剤、IL-11の機能を代替する抗体は血小板産生刺激作用を有する医薬品（医薬組成物）もしくは薬剤、IL-12の機能を代替する抗体はTh1（細胞性免疫）への誘導による免疫賦活・抗腫瘍作用を有する医薬品（医薬組成物）もしくは薬剤、IL-15の機能を代替する抗体はNK細胞の活性化による免疫賦活・抗腫瘍作用を有する医薬品（医薬組成物）もしくは薬剤、GM-CSFの機能を代替する抗体は化学療法や骨髄移植後の白血球回復促進作用を有する医薬品（医薬組成物）もしくは薬剤、CNTFの
- 15 機能を代替する抗体は抗肥満作用を有する医薬品（医薬組成物）もしくは薬剤、LIFの機能を代替する抗体は血小板産生刺激・血中コレステロール低下作用を有する医薬品（医薬組成物）もしくは薬剤、Oncostatin Mの機能を代替する抗体は造血促進作用を有する医薬品（医薬組成物）もしくは薬剤、CT-1の機能を代替する抗体は心筋保護作用を有する医薬品（医薬組成物）もしくは薬剤となることが
- 20 期待される。

また、本発明の抗体がF. IXもしくはF. IXa、およびF. Xの両方を認識する抗体のうち、F. VIIIaの機能を代替する抗体である場合には、該抗体は、出血、出血を伴う疾患、もしくは出血に起因する疾患の予防もしくは治療のための医薬品（医薬組成物）もしくは薬剤となることが期待される。

- 25 一方で、ZPIとF. Xに結合してPZの機能を代替する抗体は抗血栓作用を有する医薬品（医薬組成物）もしくは薬剤、トロンビンとTAFIに結合してTMの機能を代替

する抗体は止血促進作用を有する医薬品（医薬組成物）もしくは薬剤、トロンビンとPCに結合してPS/TMシステムの機能を代替する作用を有する医薬品（医薬組成物）もしくは薬剤となることが期待される。

また、補体C4の欠損は全身性エリテマトーデス (SLE) を引き起こすことから、

- 5 C4bの作用を代替する抗体はSLE発症抑制作用を有する医薬品（医薬組成物）もしくは薬剤となることが期待される。H因子の欠損は易化膿性感染症、自己免疫性の糸球体腎炎を引き起こすことから、H因子の作用を代替する抗体はこれら疾患の発症抑制作用を有する医薬品（医薬組成物）もしくは薬剤となることが期待される。

- 10 C4bpの欠損はベーチェット病を引き起こすことから、C4bpの作用を代替する抗体はベーチェット病発症抑制作用を有する医薬品（医薬組成物）もしくは薬剤となることが期待される。

治療または予防目的で使用される本発明の抗体を有効成分として含む医薬組成物は、必要に応じて、それらに対して不活性な適当な薬学的に許容される担体、

- 15 媒体等と混和して製剤化することができる。例えば、滅菌水や生理食塩水、安定剤、賦形剤、酸化防止剤（アスコルビン酸等）、緩衝剤（リン酸、クエン酸、他の有機酸等）、防腐剤、界面活性剤（PEG、Tween等）、キレート剤（EDTA等）、結合剤等を挙げることができる。また、その他の低分子量のポリペプチド、血清アルブミン、ゼラチンや免疫グロブリン等の蛋白質、グリシン、グルタミン、アスパラ
- 20 ギン、アルギニン及びリシン等のアミノ酸、多糖及び単糖等の糖類や炭水化物、マンニトールやソルビトール等の糖アルコールを含んでいてもよい。注射用の水溶液とする場合には、例えば生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張
- 25 液、例えば、D-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、塩化ナトリウムが挙げられ、適当な溶解補助剤、例えばアルコール（エタノール等）、ポリアルコール（プロピレングリコール、PEG等）、非イオン性界面活性剤（ポリソルベート80、HC0-50）等と併用してもよい。

また、必要に応じ本発明の抗体をマイクロカプセル(ヒドロキシメチルセルロース、ゼラチン、ポリ[メチルメタクリル酸]等のマイクロカプセル)に封入したり、コロイドドラッグデリバリーシステム(リポソーム、アルブミンミクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル等)とすることもできる(“Remington's Pharmaceutical Science 16th edition”, Oslo Ed. (1980)等参照)。さらに、薬剤を徐放性の薬剤とする方法も公知であり、本発明の抗体に適用し得る(Langer et al., J. Biomed. Mater. Res. 15: 167-277 (1981); Langer, chem. Tech. 12: 98-105 (1982); 米国特許第3, 773, 919号; 欧州特許出願公開 (EP) 第58, 481号; Sidman et al., Biopolymers 22: 547-556 (1983); EP第133, 988号)。

- 5 本発明の医薬組成物の投与量は、剤型の種類、投与方法、患者の年齢や体重、患者の症状、疾患の種類や進行の程度等を考慮して、最終的には医師の判断により適宜決定されるものであるが、一般に大人では、1日当たり、0.1~2000mgを1~数回に分けて経口投与することができる。より好ましくは1~1000mg/日、更により好ましくは50~500mg/日、最も好ましくは100~300mg/日である。これ
- 10 らの投与量は患者の体重や年齢、投与方法などにより変動するが、当業者であれば適当な投与量を適宜選択することが可能である。投与期間も、患者の治癒経過等に応じて適宜決定することが好ましい。

- また、本発明の抗体をコードする遺伝子を遺伝子治療用ベクターに組み込み、遺伝子治療を行うことも考えられる。投与方法としては、nakedプラスミドによる
- 20 直接投与の他、リポソーム等にパッケージングするか、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、ポックスウイルスベクター、アデノウイルス関連ベクター、HVJベクター等の各種ウイルスベクターとして形成するか (Adolph『ウイルスゲノム法』, CRC Press, Florida (1996) 参照)、または、コロイド金粒子等のビーズ担体に被覆 (W093/17706等) して投与すること
- 25 ができる。しかしながら、生体内において抗体が発現され、その作用を発揮できる限りいかなる方法により投与してもよい。好ましくは、適当な非経口経路 (静

脈内、腹腔内、皮下、皮内、脂肪組織内、乳腺組織内、吸入または筋肉内の経路を介して注射、注入、またはガス誘導性粒子衝撃法(電子銃等による)、点鼻薬等粘膜経路を介する方法等)により十分な量が投与される。ex vivoにおいてリポソームトランスフェクション、粒子衝撃法(米国特許第4,945,050号)、またはウイルス感染を利用して血液細胞及び骨髓由来細胞等に投与して、該細胞を動物に再導入することにより本発明の抗体をコードする遺伝子を投与してもよい。

5 また本発明は、本発明の抗体もしくは組成物を投与する工程を含む、出血、出血を伴う疾患、または出血に起因する疾患の予防および／または治療するための方法を提供する。抗体もしくは組成物の投与は、例えば、前記の方法により実施

10 することができる。

また本発明は、本発明の抗体の、本発明の(医薬)組成物の製造のための使用に関する。

さらに本発明は、少なくとも本発明の抗体もしくは組成物を含む、上記方法に用いるためのキットを提供する。該キットには、その他、注射筒、注射針、薬学的に許容される媒体、アルコール綿布、絆創膏、または使用方法を記載した指示書等をパッケージしておくこともできる。

15 図面の簡単な説明

図1はpcDNA4-g4Hの挿入領域を表した図である。

20 図2はpcDNA4-g4LおよびpIND-g4Lの挿入領域を表した図である。

図3はpIND-g4Hの挿入領域を表した図である。

図4は抗F. IXa抗体XB12と抗F. X抗体SB04、SB21、SB42、SB38、SB30、SB07、SB05、SB06、SB34により作製した抗F. IXa/抗F. X 二種特異性抗体を用い、F. VIIa様活性を測定した結果を示している。抗体溶液の濃度は10 μ g/mL(最終濃度1 μ g/mL)である。結果9種の二種特異性抗体でF. VIIa様活性の上昇を示し、XB12/SB04、XB12/SB21、XB12/SB42、XB12/SB38、XB12/SB30、XB12/SB07、

25 図5は抗F. IXa抗体XB12と抗F. X抗体SB04、SB21、SB42、SB38、SB30、SB07、SB05、SB06、SB34により作製した抗F. IXa/抗F. X 二種特異性抗体を用い、F. VIIa様活性を測定した結果を示している。抗体溶液の濃度は10 μ g/mL(最終濃度1 μ g/mL)である。結果9種の二種特異性抗体でF. VIIa様活性の上昇を示し、XB12/SB04、XB12/SB21、XB12/SB42、XB12/SB38、XB12/SB30、XB12/SB07、

XB12/SB05、XB12/SB06、XB12/SB34の順に活性が強かった。

図 5 は抗F. IXa抗体XT04と抗F. X抗体SB04、SB21、SB42、SB38、SB30、SB07、SB05、SB06、SB34により作製した抗F. IXa/抗F. X二種特異性抗体またはXT04抗体を用い、F. VIIIA様活性を測定した結果を示している。抗体溶液の濃度は

5 10 μ g/mL (最終濃度 1 μ g/mL) である。結果、XT04/SB04、XT04/SB21、XT04/SB42、XT04/SB38、XT04/SB30、XT04/SB07、XT04/SB05、XT04/SB06、XT04/SB34はF. VIIIA様活性の上昇を示した。

図 6 は、図 4 の中で最も活性の高かったXB12/SB04についてF. VIIIA様活性の濃度依存性を測定した結果を示している。結果XB12/SB04は濃度依存的にFVIIIA様
10 活性の上昇を示した。

図 7 はXB12/SB04、XB12/SB21、XB12/SB42、XB12/SB38、XB12/SB30、XB12/SB07、XB12/SB05、XB12/SB06、XB12/SB34を用い、血漿凝固アッセイを測定した結果を示している。抗体溶液の濃度はXB12/SB06に関しては3.4 μ g/mL、それ以外は20 μ g/mLである。結果、XB12/SB04、XB12/SB21、XB12/SB42、XB12/SB38、
15 XB12/SB30、XB12/SB07、XB12/SB05、XB12/SB06、XB12/SB34は抗体非存在下と比較して、凝固時間 (APTT) の短縮効果を示した。

図 8 はXT04/SB04、XT04/SB21、XT04/SB42、XT04/SB38、XT04/SB30、XT04/SB07、XT04/SB05、XT04/SB06、XT04/SB34を用い、血漿凝固アッセイを測定した結果を示している。抗体溶液の濃度はXT04/SB06に関しては10 μ g/mL、それ以外は
20 20 μ g/mLである。結果、XT04/SB04、XT04/SB21、XT04/SB42、XT04/SB38、XT04/SB30、XT04/SB07、XT04/SB05、XT04/SB06は抗体非存在下と比較して、凝固時間 (APTT) の短縮効果を示した。XT04/SB34は凝固時間 (APTT) の短縮は認められなかった。

図 9 は図 7、図 8 の中で最も凝固時間 (APTT) の短縮効果の高かったXB12/SB04
25 について濃度依存性を測定した結果が示されている。結果XB12/SB04は濃度依存的に凝固時間 (APTT) の短縮効果を示した。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

5

〔実施例1〕 抗原および免疫

ヒトAR1鎖及びAR2鎖それぞれの細胞外領域のC末端にFLAG (AR1FLAG、AR2FLAG) もしくはHis6 (AR1His、AR2His) のタグを付加した可溶型受容体の発現ベクターをCHO細胞に導入し、その培養上清からアフィニティーカラムを用いて精製した。マウスプロB細胞株Ba/F3にヒトAR1鎖の細胞外領域とG-CSF受容体細胞内領域とのキメラ分子の発現ベクターを導入し、高発現細胞を樹立した。同様にヒトAR2鎖の細胞外領域とG-CSF受容体細胞内領域とのキメラ分子の高発現細胞を樹立した。それぞれの細胞をBALB/cの腹腔に免疫した。脾臓を摘出する3日前にAR1HisもしくはAR2Hisを静注した。

15

〔実施例2〕 scFv提示ライブラリーからの抗体分離

(a) ファージライブラリーのパンニング

免疫マウスの脾臓よりpolyA (+) RNAを抽出し、RT-PCRにてscFvを合成し、scFvがf1ファージのgene3との融合蛋白として発現するファージミドライブラリーを構築した (J. Immun. Methods, 201, (1997), 35-55)。ライブラリーの大腸菌 (2×10^9 cfu) を50 mL 2xYTAG (100 μ g/mLアンピシリン、2%グルコースを含む2xTY) に植菌し、OD 600 0.4~0.5まで37℃にて培養した。4 $\times 10^{11}$ のヘルパーファージVCSM13を加え37℃、15分間静置して感染させた。ここに450 mL 2xYTAG、25 μ L 1mol/L IPTGを添加し、26℃ 10時間培養した。遠心分離にて培養上清を回収し、100mL PEG-NaCl (10%ポリエチレングリコール8000, 2.5 mol/L NaCl) を混合後、4℃、60分間静置した。10,800 x g、30分間遠心にてファージを沈殿させ、

25

- 39 -

沈殿物を40 mLの水に懸濁し、8 mL PEG-NaClを混合後、4℃、20分間静置した。10,800 x g、30分間遠心にてファージを沈殿させ5 mL PBSに懸濁した。実施例1で調製したAR1FLAGとAR2FLAGはNo-Weigh Premeasured NHS-PE04-Biotin Microtubes (Pierce) を用いてビオチン標識した。ファージライブラリーに100 pmolの

5 ビオチン標識AR1FLAGもしくはAR2FLAGを加え、60分間抗原と接触させた。5% M-PBS (5% スキムミルクを含むPBS) で洗浄したStreptavidin MagneSphere (Promega) 600 μ Lを加え、15分間結合させた。ビーズを1 mLのPBST (0.1% Tween-20を含むPBS) とPBSにて3回ずつ洗浄した。0.8 mLの0.1 mol/L グリシン/HCl (pH2.2) 中にビーズを5分間懸濁し、ファージを溶出した。回収したファージ溶液に45

10 μ L 2 mol/L Trisを添加して中和し、対数増殖期 (OD 600 = 0.4~0.5) XL1-Blue 10 mLに添加、37℃、30分間静置することで感染させた。これを2xYTAGプレートに広げ、30℃で培養した。コロニーを回収し、2xYTAGに植菌、OD 600 0.4~0.5まで37℃にて培養した。培養液10 mLに5 μ L 1mol/L IPTG、 10^{11} pfuヘルパーファージ (VCSM13) を添加し37℃ 30分間静置した。遠心集菌後、25 μ g/mLカナマイシンを含む2xYTAG 100mLに再懸濁し、30℃、10時間培養した。遠心分離にて培養上清を回収し、20 mL PEG-NaClを混合後、4℃、20分間静置した。10,800 x g、30分間遠心にてファージを沈殿させ、2 mL PBSに懸濁したものを次のパンニングに供した。2回目のパンニングではビーズをPBSTとPBSにて5回ずつ洗浄した。溶出したファージを感染させ得られた大腸菌からAR鎖結合ファージを産生するクローン

20 ーをELISAにて選択した。

(b) ファージELISA

上記のシングルコロニーを150 μ L 2xYTAGに植菌し、30℃で一晩培養した。この5 μ Lを500 μ L 2xYTAGに植菌、37℃、2時間培養後、ヘルパーファージ 2.5×10^9 pfuと0.3 μ L 1mol/L IPTGを含む2xYTAGを100 μ L添加し37℃にて30分間静置した。

25 続いて30℃にて一晩培養し、遠心上清をELISAに供した。StreptaWell 96マイク

- 40 -

ロタイタープレート (Roche) を1.0 μ g/mLビオチン標識AR1FLAGもしくはAR2FLAGを含むPBS 100 μ Lにて一晩コートした。PBSTにて洗浄し抗原を除いた後、2 w/v % M-PBS 200 μ Lで一晩ブロッキングした。2% (w/v) M-PBSを除き、ここに培養上清を加え40分間静置し抗体を結合させた。洗浄後、結合ファージは2 w/v % M-PBSにて希釈したHRP結合抗M13抗体 (Amersham Pharmacia Biotech) とBM blue POD基質 (Roche) で検出し、硫酸の添加により反応を停止した後、A450の値を測定した。

(c) 配列決定とクローン選択

10 ELISAにて陽性であったクローンのファージ液からプライマーPBG3-F1 (5' - CAGCTATGAAATACCTATTGCC -3' / 配列番号 : 27) とPBG3-R1 (5' - CTTTTCATAATCAAAATCACCGG -3' / 配列番号 : 28) を用いてPCRにてscFv領域を増幅し、その塩基配列決定した。ファージ液1 μ L、10 x KOD Dash緩衝液2 μ L、10 μ mol/Lプライマーを0.5 μ Lづつ、KOD Dashポリメラーゼ (東洋紡績、2.5 U/ μ L) 0.3 μ Lを含むPCR反応液20 μ Lを、Perkin Elmer9700で96 $^{\circ}$ C、10秒、55 $^{\circ}$ C、10秒、72 $^{\circ}$ C、30秒、30サイクルの増幅を行なった。PCR後、5 μ Lの反応液にExoSAP-IT (アマシャム) を3 μ L添加し、37 $^{\circ}$ C、20分間、引き続き80 $^{\circ}$ C、15分間保温した。このサンプルについてPBG3-F2 (5' - ATTGCCTACGGCAGCCGCT -3' / 配列番号 : 29) あるいはPBG3-R2 (5' - AAATCACCGGAACCAGAGCC -3' / 配列番号 : 30) をプライマーとしてBigDye Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems) にて反応を行い、Applied Biosystems PRISM 3700 DNA Sequencerで泳動した。塩基配列から推定されるアミノ酸配列のCDR3の異なるクローンを抗AR1鎖及び抗AR2鎖についてそれぞれ45クローンずつ選択した。

25 [実施例3] 二種特異性抗体の発現

scFv-CH1-Fcとして発現させるためにCAGGプロモーターで駆動されるヒトシグ

- 41 -

ナル配列とイントロン-CH1-Fc（ヒトIgG4 cDNA）の間にSfiIサイトを介してscFvを挿入できる発現ベクターpCAGGss-g4CHヘテロIgG4を構築した。ヘテロ分子として発現させるためにIgG1のknobs-into-holes（Protein Engineering vol. 9, 617-621, 1996）を参考にIgG4のCH3部分へのアミノ酸置換体を作成した。AタイプはY349C、T366Wの置換体である。BタイプはE356C、T366S、L368A、Y407Vの置換体である。両者のヒンジ部分にも置換（-ppcpScp- → -ppcpPcp-）を導入した。またAタイプにはヒトIL-3のシグナル配列を、BタイプにはヒトIL-6のシグナル配列を用いて構築した（pCAGG-IL3ss-g4CHPa, pCAGG-IL6ss-g4CHPb）。塩基配列より選択したクローンのscFv領域のPCR産物をSfiI処理し、抗AR1鎖クローンはpCAGG-IL3ss-g4CHPaに、抗AR2鎖クローンはpCAGG-IL3ss-g4CHPbにサブクローニングした。抗AR1鎖及び抗AR2鎖クローン45 x 45の合計2025種類の全組合せについて発現ベクターをHEK293細胞にリポフェクトアミン2000を用いてトランスフェクションし、3日後の培養上清を回収した。

15 〔実施例4〕 リガンド機能代替二種特異性抗体の分離

（a）Ba/F3増殖アッセイ

BaF3-ARGはマウスIL-3依存性増殖細胞Ba/F3にAR1鎖及びAR2鎖の細胞外領域とG-CSF受容体の細胞内領域とのキメラ分子の発現ベクターを導入して樹立した。BaF3-ARGはIFN α に依存して増殖した。3度洗浄したウェル当り 1×10^3 個の細胞およびサンプルを含む0.1mLの培地で96ウェルプレートに播種した。4日間培養後10 μ Lの生細胞数測定試薬SF（nacalai tesque）を添加し、2時間37℃保温した後A450を測定した。

（b）Daudi細胞増殖抑制アッセイ

25 Daudi細胞はIFNに対して高感受性を示すヒトB細胞株である。サンプルを含む0.1mLの培地でウェル当り 6.25×10^3 個の細胞を96ウェルプレートに播種した。4日

間培養後10 μ Lの生細胞数測定試薬SF (nacalai tesque) を添加し、2時間37℃保温した後、A450を測定した。

(c) リガンド機能代替二種特異性抗体の配列

- 5 上記スクリーニングにて選択された抗体の可変領域のアミノ酸配列を、配列番号：1～26に示す。各抗体の名称および配列番号との関係は、上記表1に示す。

〔実施例5〕 Factor IXa (F. IXa) に対する非中和抗体の作製

5-1. 免疫およびハイブリドーマ作製

- 10 BALB/cマウス（雄、免疫開始時6週齢、日本チャールス・リバー）8匹および MRL/lprマウス（雄、免疫開始時6週齢、日本チャールス・リバー）5匹に、Factor IXa β (Enzyme Research Laboratories, Inc.) を以下の通り免疫した。初回免疫としてFCA（フロイント完全アジュバントH37 Ra (Difco laboratories)）でエマルジョン化したFactor IXa β を40 μ g/head皮下投与した。2週間後にFIA（フロイント不完全アジュバント (Difco laboratories)）でエマルジョン化したFactor IXa β を40 μ g/head皮下投与した。以後1週間間隔で追加免疫を3～7回行った。Factor IXa β に対する血清抗体価の上昇を5-2に示したELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) で確認後、最終免疫としてPBS (-) (カルシウムイオン、マグネシウムイオンを含まないphosphate buffered saline) に希釈したFactor IXa β を40 μ g/head静脈内投与した。最終免疫の3日後、マウスの脾臓細胞とマウスミエローマ細胞P3X63Ag8U.1 (P3U1と称す、ATCC CRL-1597) を、PEG1500 (ロシュ・ダイアグノスティックス) を用いた常法に従い細胞融合した。10%FBS (Invitrogen) を含むRPMI1640培地 (Invitrogen) (以下、10%FBS/RPMI1640と称す) に懸濁した融合細胞を96 well culture plateに播種し、融合1, 2, 3, 5
- 25 日後にHAT選択培地 (10%FBS/RPMI1640 / 2%HAT 50x concentrate (大日本製薬) / 5% BM-Condimed H1 (ロシュ・ダイアグノスティックス)) への置換を行うこ

- 43 -

とにより、ハイブリドーマの選択培養を行った。融合後8日目または9日目に採取した培養上清を用いて、5-2に示したELISAによりFactor IXaに対する結合活性を測定することにより、Factor IXa結合活性を有するハイブリドーマを選択した。続いて5-3に示した方法でFactor IXaの酵素活性に対する中和活性を測定し、

- 5 Factor IXaに対する中和活性を有さないハイブリドーマを選択した。ハイブリドーマは、96 well culture plateに1 wellあたり1個の細胞を播種することによる限界希釈を2回行ってクローン化した。顕微鏡観察により単一コロニーであることが確認された細胞について、5-2、5-3に示したELISAおよび中和活性測定を行い、クローンを選択した。5-4に示した方法により、クローン化した抗体
- 10 の腹水を作製し、腹水から抗体を精製した。精製抗体が、APTT（活性化部分トロンボプラスチン時間）を延長させないことを、5-5に示した方法で確認した。

5-2. Factor IXa ELISA

- Coating buffer (100mM sodium bicarbonate, pH 9.6, 0.02% sodium azide)
- 15 で1 μ g/mLに希釈したFactor IXa β を、Nunc-Immuno plate (Nunc-ImmunoTM 96 MicroWellTM plates MaxiSorpTM (Nalge Nunc International)) に100 μ L/wellで分注後、4 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベーションした。Tween (R) 20を含むPBS (-) で3回洗浄後、diluent buffer (50mM Tris-HCl, pH8.1, 1% bovine serum albumin, 1mM MgCl₂, 0.15M NaCl, 0.05% Tween (R) 20, 0.02% sodium azide) でplateを室
- 20 温で2時間blockingした。Bufferを除去後、plateにdiluent bufferで希釈したマウスの抗血清またはハイブリドーマの培養上清を100 μ L/well添加し、室温で1時間インキュベーションした。Plateを3回洗浄後、diluent bufferで1/2000希釈したアルカリホスファターゼヤギ抗マウスIgG (H+L) (Zymed Laboratories) を100 μ L/well添加し、室温で1時間インキュベーションした。Plateを6回洗浄後、
- 25 発色基質Blue-PhosTM Phosphate Substrate (Kirkegaard & Perry Laboratories) を100 μ L/well添加し、室温で20分インキュベーションした。

- 44 -

Blue-Phos™ Stop Solution (Kirkegaard & Perry Laboratories) を100 μ L/well 添加した後、595nmにおける吸光度をMicroplate Reader Model 3550 (Bio-Rad Laboratories) で測定した。

5 5-3. Factor IXa中和活性測定

Phospholipid (Sigma-Aldrich) を注射用蒸留水で溶解し、超音波処理を施すことにより、400 μ g/mLのphospholipid溶液を調製した。0.1%ウシ血清アルブミンを含むトリス緩衝生理食塩液（以下、TBSB）40 μ Lと30ng/mL Factor IXa β (Enzyme Research Laboratories) 10 μ Lと400 μ g/mL phospholipid溶液5 μ Lと
10 100 mM CaCl₂、20 mM MgCl₂を含むTBSB 5 μ Lとハイブリドーマ培養上清10 μ Lを96穴プレート中で混和し、室温で1時間インキュベーションした。この混合溶液に、50 μ g/mL Factor X (Enzyme Research Laboratories) 20 μ Lおよび3U/mL Factor VIIIa (Amrican diagnostica) 10 μ Lを加え、室温で30分間反応させた。これに10 μ Lの0.5M EDTAを添加することにより反応を停止させた。この反応溶液
15 に、50 μ LのS-2222溶液 (Chromogenix) を添加し、室温で30分間インキュベーションした後、測定波長405nm、対照波長655nmにおける吸光度をMicroplate Reader Model 3550 (Bio-Rad Laboratories, Inc.) により測定した。

5-4. 腹水の作製および抗体の精製

20 樹立したハイブリドーマの腹水作製は常法に従って行った。すなわち、in vitroで培養したハイブリドーマ2 x 10⁶個を、あらかじめプリスタン (2, 6, 10, 14-tetramethylpentadecane; 和光純薬工業) を2回腹腔内に投与しておいたBALB/cマウス（雄、実験開始時5~7週齢、日本チャールス・リバー）またはBALB/cヌードマウス（雌、実験開始時5~6週齢、日本チャールス・リバーおよび日本クレア）の腹腔内に移植した。移植後1~4週目で腹部が肥大したマウスから
25 腹水を回収した。

腹水からの抗体精製はProtein G Sepharose™ 4 Fast Flow (Amersham Biosciences) カラムを用いて行った。Binding Buffer (20 mM sodium acetate, pH5.0) にて2倍希釈した腹水をカラムにアプライし、10カラム容量のBinding Bufferで洗浄した。5カラム容量のElution Buffer (0.1 M glycine-HCl, pH2.5) にて抗体を溶出し、Neutralizing Buffer (1 M Tris-HCl, pH9.0) で中和した。これをCentriprep 10 (Millipore) にて濃縮し、TBS (50mM Tris-buffered Saline) に溶媒を置換した。抗体濃度は、280nmの吸光度から、 $A = 13.5$ として算出した。吸光度の測定は、DU-650 (Beckman Coulter) にて測定した。

10

5-5. APTT (活性化部分トロンボプラスチン時間) の測定

APTTはCR-A (Amelung) を接続したKC10A (Amelung) により測定した。TBSBで希釈した抗体溶液 50 μ L、標準ヒト血漿 (Dade Behring) 50 μ L及びAPTT試薬

(Dade Behring) 50 μ Lの混合液を37℃で3分間加温した。20 mMのCaCl₂ (Dade Behring) 50 μ Lを同混合液に加えることにより凝固反応を開始させ、凝固時間を測定した。

15

〔実施例6〕 Factor X (F.X) に対する非中和抗体の作製

6-1. 免疫およびハイブリドーマ作製

20 BALB/cマウス (雄、免疫開始時6週齢、日本チャールス・リバー) 8匹および MRL/lprマウス (雄、免疫開始時6週齢、日本チャールス・リバー) 5匹に、Factor X (Enzyme Research Laboratories) を以下の通り免疫した。初回免疫としてFCAでエマルジョン化したFactor Xを40 μ g/head皮下投与した。2週間後にFIAでエマルジョン化したFactor Xを20または40 μ g/head皮下投与した。以後1週間間隔で追加免疫を合計3~6回行った。Factor Xに対する血清抗体価の上昇を6-2に示したELISAで確認後、最終免疫としてPBS (-) に希釈したFactor Xを20または

25

- 46 -

40 μ g/head 静脈内投与した。最終免疫の3日後、マウスの脾臓細胞とマウスミエローマ細胞P3U1を、PEG1500を用いた常法に従い細胞融合した。10%FBS/RPMI1640培地に懸濁した融合細胞を96 well culture plateに播種し、融合1, 2, 3, 5日後にHAT選択培地への置換を行うことにより、ハイブリドーマの選択培養を行った。融合後8日目に採取した培養上清を用いて6-2に示したELISAによりFactor Xに対する結合活性を測定した。Factor X結合活性を有するハイブリドーマを選択し、6-3に示した方法でFactor Xaの酵素活性に対する中和活性を測定した。Factor Xaに対する中和活性を有さないハイブリドーマを、限界希釈を2回行うことによりクローン化した。5-4に示した方法により、クローン化した抗体の腹水を作製し、腹水から抗体を精製した。精製抗体が、APTTを延長させないことを、5-5に示した方法で確認した。

6-2. Factor X ELISA

Coating bufferで1 μ g/mLに希釈したFactor Xを、Nunc-Immuno plateに
15 100 μ L/wellで分注後、4℃で一晩インキュベーションした。Tween (R) 20を含むPBS (-) で3回洗浄後、diluent bufferでplateを室温で2時間blockingした。
Bufferを除去後、plateにdiluent bufferで希釈したマウスの抗血清またはハイブリドーマの培養上清を添加し、室温で1時間インキュベーションした。Plateを3回洗浄後、diluent bufferで1/2000希釈したアルカリホスファターゼヤギ抗マ
20 ウスIgG (H+L) を添加し、室温で1時間インキュベーションした。Plateを6回洗浄後、発色基質Blue-Phos™ Phosphate Substrate (Kirkegaard & Perry Laboratories) を100 μ L/well添加し、室温で20分インキュベーションした。
Blue-Phos™ Stop Solution (Kirkegaard & Perry Laboratories) を100 μ L/well添加した後、595nmにおける吸光度をMicroplate Reader Model 3550 (Bio-Rad
25 Laboratories) で測定した。

- 47 -

6-3. Factor Xa中和活性測定

- TBSBで1/5希釈したハイブリドーマ培養上清10 μ Lと40 μ Lの250 pg/mL Factor Xa (Enzyme Research Laboratories) を含むTBCP (2.78 mM CaCl₂, 22.2 μ Mリン脂質 (フォスファチジルコリン: フォスファチジルセリン=75:25、Sigma-Aldrich) を含むTBSB) を混和し、室温で1時間インキュベーションした。この混合溶液に、20 μ g/mLプロトロンビン (Enzyme Research Laboratories) および100 ng/mL活性化凝固第V因子 (Factor Va (Haematologic Technologies)) を含むTBCPを50 μ L添加して室温で10分間反応させた。0.5 M EDTAを10 μ L添加することにより反応を停止させた。この反応溶液に、1 mM S-2238溶液 (Chromogenix) を50 μ L添加し、室温で30分間インキュベーションした後、405 nmにおける吸光度をMicroplate Reader Model 3550 (Bio-Rad Laboratories) で測定した。

〔実施例7〕 キメラ二種特異性抗体発現ベクターの構築

7-1. ハイブリドーマからの抗体可変領域をコードするDNA断片の調製

- 抗F. IXa抗体あるいは抗F. X抗体を産生するハイブリドーマから、QIAGEN (R) RNeasy (R) Mini Kit (QIAGEN) を用いて説明書記載の方法に従い全RNAを抽出した。全RNAを40 μ Lの滅菌水に溶解した。精製されたRNA1~2 μ gを鋳型に、SuperScript cDNA合成システム (Invitrogen) を用いて説明書記載の方法に従いRT-PCR法により一本鎖cDNAを合成した。

20

7-2. 抗体H鎖可変領域のPCRによる増幅と配列解析

- マウス抗体H鎖可変領域 (VH) cDNAの増幅用プライマーとして、Krebberらの報告 (J. Immunol. Methods 1997;201:35-55) に記載のHBプライマー混合物、およびHFプライマー混合物を用意した。各0.5 μ Lの100 μ M HB プライマー混合物および100 μ M HFプライマー混合物を用いて、反応液25 μ L (7-1で調製したcDNA溶液2.5 μ L、KOD plus buffer (東洋紡績) 、0.2mM dNTPs, 1.5mM MgCl₂, 0.75

- 48 -

units DNA polymerase KOD plus (東洋紡績) を調製した。PCRは、サーマルサイクラーGeneAmp PCR system 9700 (Parkin Elmer) を用いて、cDNA断片の増幅の効率性に応じて、条件A (98℃で3分間加熱後、98℃ 20秒、58℃ 20秒、72℃ 30秒からなる反応を1サイクルとして32サイクル) ないし条件B (94℃で3分間加熱後、94℃ 20秒、46℃ 20秒、68℃ 30秒からなる反応を1サイクルとして5サイクル、さらに94℃ 20秒、58℃ 20秒、72℃ 30秒からなる反応を1サイクルとして30サイクル) のいずれかの条件で行った。PCR後、反応液を1% アガロースゲル電気泳動に供した。目的のサイズ (約400bp) の増幅断片をQIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) を用い、添付説明書記載の方法で精製し、滅菌水 30 μ lで溶出した。各DNA断片の塩基配列は、BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用い、DNAシーケンサーABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) にて、添付説明書記載の方法に従い決定した。本方法により決定した配列群を解析ソフトGENETYX-SV/RC Version 6.1 (Genetyx) にて比較解析し、異なる配列を有するものを選択した。

7-3. クローニング用抗体可変領域DNA断片の調製

クローニング用制限酵素Sfi I切断サイトを抗体可変領域増幅断片の両末端へ付加するために、以下の操作を行った。

Sfi I切断部位付加VH断片 (Sfi I-VH) 増幅のために、プライマーHBの (Gly4Ser) 2- リンカー配列をSfi I切断部位を有するに示す配列 (配列番号: 31) へ変更したもの (プライマー VH-5' end) を用意した。各0.5 μ lの10 μ M 配列特異的プライマーVH-5' endおよび 10 μ M プライマーscfor (J. Immunol. Methods 1997; 201: 35-55) を用いて、反応液20 μ L (7-2で調製した精製VH cDNA増幅断片溶液1 μ l, KOD plus buffer (東洋紡績)、0.2mM dNTPs, 1.5mM

MgCl₂, 0.5 units DNA polymerase KOD plus (東洋紡績) を調製した。PCRは、サーマルサイクラーGeneAmp PCR system 9700 (Parkin Elmer) を用いて、断片

- 49 -

の増幅の効率性に従い、条件A（98℃で3分間加熱後、98℃ 20秒、58℃ 20秒、72℃ 30秒からなる反応を1サイクルとして32サイクル）ないし条件B（94℃で3分間加熱後、94℃ 20秒、46℃ 20秒、68℃ 30秒からなる反応を1サイクルとして5サイクル、さらに94℃ 20秒、58℃ 20秒、72℃ 30秒からなる反応を1サイクルとして30サイクル）のいずれかの条件で行った。PCR後、反応液を1% アガロースゲル電気泳動に供した。目的のサイズ（約400bp）の増幅断片をQIAquick Gel Extraction Kit（QIAGEN）にて添付説明書記載の方法で精製し、滅菌水30 μ Lで溶出した。

マウス抗体L鎖可変領域（VL） cDNA断片増幅のために、まずKrebberらの報告（J. Immunol. Methods 1997; 201: 35-55）記載の各0.5 μ Lの100 μ M LBプライマー混合物および 100 μ M LFプライマー混合物を用いて、反応液 25 μ L（7-1で調製したc-DNA溶液2.5 μ L, KOD plus buffer（東洋紡績）、0.2mM dNTPs, 1.5mM MgCl₂, 0.75 units DNA polymerase KOD plus（東洋紡績））を調製した。PCRは、サーマルサイクラーGeneAmp PCR system 9700（Parkin Elmer）を用いて、断片の増幅の効率性に従い、94℃で3分間加熱後、94℃ 20秒、46℃ 20秒、68℃ 30秒からなる反応を1サイクルとして5サイクル、さらに94℃ 20秒、58℃ 20秒、72℃ 30秒からなる反応を1サイクルとして30サイクルの条件で行った。PCR後、反応液を1% アガロースゲル電気泳動に供した。目的のサイズ（約400bp）の増幅断片をQIAquick Gel Extractio Kit（QIAGEN）にて添付説明書記載の方法で精製し、滅菌水30 μ Lで溶出した。該断片はそのC末端にプライマーLF由来の（Gly4Ser）3-リンカー配列が付加された状態にある。該断片C末端へSfi I切断部位を付加する目的で、プライマーLFの（Gly4Ser）3-リンカー配列をSfi I切断部位を有するに示す配列（配列番号：32）へ変更したもの（プライマー VL-3' end）を用意した。Sfi I 切断部位付加VL断片（Sfi I-VL）増幅のために、各0.5 μ Lの10 μ M VL-3' endプライマー混合物および 10 μ M scbackプライマーを用いて、反応液 20 μ L（精製VL cDNA増幅断片溶液1 μ L, KOD plus buffer（東洋紡績）、0.2mM

- 50 -

dNTPs, 1.5mM MgCl₂, 0.5 units DNA polymerase KOD plus (東洋紡績) を調製した。PCRは、サーマルサイクラーGeneAmp PCR system 9700 (Parkin Elmer) を用いて、94℃で3分間加熱後、94℃ 20秒、46℃ 20秒、68℃ 30秒からなる反応を1サイクルとして5サイクル、さらに94℃ 20秒、58℃ 20秒、72℃ 30秒からなる反応を1サイクルとして30サイクルの条件で行った。PCR後、反応液を1% アガロースゲル電気泳動に供した。目的のサイズ (約400bp) の増幅断片をQIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) を用い、添付説明書記載の方法で精製し、滅菌水 30 μ Lで溶出した。

精製Sfi I-VHおよびSfi I-VL断片はSfi I (タカラバイオ) にて添付説明書記載の方法に従い反応液を調製し、50℃で一晩消化を行った。その後、反応液をQIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) を用いて添付説明書記載の方法で精製し、該キット添付のBuffer EB 30 μ Lで溶出した。

7-4. ヒトIgG4-マウスキメラ二種特異性IgG抗体発現用プラスミド

目的の二種特異性IgG抗体を産生する際に、各H鎖のヘテロ分子を形成させるためにIgG1のknobs-into-holes技術 (Ridway et al., Protein Eng. 1996; 9: 617-621) を参考にIgG4のCH3部分へのアミノ酸置換体を作製した。タイプa

(IgG4 γ a) はY349C、T366W置換体であり、タイプb (IgG4 γ b) はE356C、T366S、L368A、Y407Vの置換体である。さらに、両置換体のヒンジ領域にも置換 (-

ppcpScp- - > -ppcpPcp-) を導入した。本技術により、殆どヘテロ体となり得るが、L鎖についてはその限りでなく、不必要な抗体分子の生成がその後の活性測定へ影響を及ぼしかねない。そのため、本方策では各特異性を有する抗体分子片腕 (HL分子と称する) を別々に発現させ細胞内で目的型二種特異性IgG抗体を効率的に作らせる為に各HL分子に対応する発現ベクターとして異なる薬剤で誘導がかかるものを用いた。

抗体分子片腕 (便宜上右腕HL分子と称する) の発現用として、テトラサイクリ

- 51 -

- ン誘導型ベクター pcDNA4 (Invitrogen) へH鎖ないしL鎖それぞれの該領域 (図 1 ないし図 2)、すなわち動物細胞用シグナル配列 (IL3ss) (Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1984; 81: 1075) の下流に適当なマウス抗体可変領域 (VHないしVL) とヒトIgG4 γ a定常領域 (配列番号: 3 3) ないし κ 定常領域 (配列番号: 3 4) を組み込んだもの (pcDNA4-g4HないしpcDNA4-g4L) を作製した。まず、pcDNA4をそのマルチクローニングサイトに存在する制限酵素切断サイトEco RVおよびNot I (タカラバイオ) で消化した。適当な抗体可変領域を有するキメラ二種特異性抗体右腕H鎖ないしL鎖発現ユニット (それぞれ約1.6kbないし約1.0kb) をXho I (タカラバイオ) で消化した後に、QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) にて添付説明書記載の方法で精製し、DNA polymerase KOD (東洋紡績) を用いて添付説明書記載の反応液組成にて72℃10分間反応させ、末端を平滑化した。該平滑化末端断片をQIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) にて添付説明書記載の方法で精製し、Not I (タカラバイオ) で消化した。該Not I-blunt断片 (それぞれ約1.6kbないし1.0kb) と該Eco RV-Not Iで消化したpcDNA4を、
- 15 Ligation High (東洋紡績) を用いて添付説明書記載の方法に従い連結反応を行った。該反応液により大腸菌DH5 α 株 (Competent high DH5 α (東洋紡績)) を形質転換した。得られたアンピシリン耐性クローンよりQIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) を用いて各々プラスミドDNAを単離した。

- もう一方の片腕 (便宜上左腕HL分子と称する) はエクダイソン類似体誘導型ベ
- 20 クター pIND (Invitrogen) へH鎖ないしL鎖それぞれの (図2ないし図3)、すなわち動物細胞用シグナル配列 (IL3ss) (EMBO. J. 1987; 6: 2939) の下流に適当なマウス抗体可変領域 (VHないしVL) とヒトIgG4 γ b定常領域 (配列番号: 3 5) ないし κ 定常領域 (配列番号: 3 4) を組み込んだもの (pIND-g4HないしpIND-g4L) を前述の方法に則り作製し、各々のプラスミドDNAを単離した。

25

7-5. 二種特異性抗体発現ベクター構築

- 52 -

7-4で調製されたテトラサイクリン誘導型発現プラスミド（pcDNA4-g4HないしpcDNA4-g4L）をSfi Iで消化し、反応液を1% アガロースゲル電気泳動に供した。もともと有していた抗体可変領域部分（VHないしVL（図1ないし図2参照））が除かれた断片（約5kb）をQIAquick Gel Extraction Kit（QIAGEN）を用い、添付

5 説明書記載の方法で精製し、滅菌水30 μ Lで溶出した。該断片と、それぞれに対応する7-3で調製されたSfi I 消化抗F. IXa抗体由来Sfi I-VHないしSfi I-VL断片をQuick Ligation Kit（New England Biolabs）を用いて添付説明書記載の方法に従い連結反応を行った。該反応液により大腸菌DH5 α 株（Competent high DH5 α （東洋紡績））を形質転換した。また、7-4で調製されたSfi I消化エク

10 ダイソン類似体誘導型発現プラスミド（pIND-g4HないしpIND-g4L）から、上述と同様の手法で抗体可変領域部分（VHないしVL（図2ないし図3参照））を除いた断片と、それぞれに対応する7-3で調製されたSfi I消化抗F. X抗体由来Sfi I-VHないしSfi I-VL断片を、同様の手法にて組込んだ。

得られた各々のアンピシリン耐性形質転換体は、挿入断片を挟み込むようなブ

15 ライマーを用いて、コロニーPCR法にて目的断片の挿入を確認した。まず、抗F. IXa抗体キメラH鎖ないしL鎖発現ベクターのために、挿入部位上流に存在するCMV Forward priming siteへアニールする21-merのプライマーCMVF（配列番号：36）と挿入部位下流に存在するBGH Reverse priming siteへアニールする18-merのプライマーBGHR（配列番号：37）を合成した（Sigma Genosys）。抗F. X

20 抗体キメラH鎖ないしL鎖発現ベクターのために、挿入部位上流へアニールする24-merのプライマーEcdF（配列番号：38）と挿入部位下流に存在するBGH Reverse priming siteへアニールする18-merのプライマーBGHR（配列番号：37）を合成した（Sigma Genosys）。コロニーPCRのために、反応液20 μ L（各10 μ Mプライマー0.2 μ L、KOD dash buffer（東洋紡績）、0.2mM dNTPs、0.75

25 units DNA polymerase KOD dash（東洋紡績））を調製した。該反応液へ、形質転換株細胞を適量投入しPCRを行った。PCRは、サーマルサイクラーGeneAmp PCR

- 53 -

system 9700 (Parkin Elmer) を用いて、96℃で1分間加熱後、96℃ 10秒、55℃ 10秒、72℃ 30秒からなる反応を1サイクルとして30サイクル反応させる条件より行った。PCR後、反応液を1% アガロースゲル電気泳動に供し、目的サイズの増幅断片が得られたクローンを選択した。該PCR産物は、ExoSAP-IT (Amersham

- 5 Biosciences) を用いて添付説明書に従い、過剰のプライマーとdNTPsの不活性化を行った。各DNA断片の塩基配列は、BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用い、DNAシーケンサーABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) にて添付説明書記載の方法に従い決定した。本方法により決定した配列群を解析ソフトGENETYX-SV/RC Version 6.1 (Genetyx)
- 10 にて解析し、VHについて挿入欠失変異等の入っていない目的クローンを、また、VLについてハイブリドーマで使用されたP3U1由来偽VL遺伝子とは異なり挿入欠失変異等のは入っていない目的クローンを選択した。

- 該目的クローンから、QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) を用いて各々プラスミドDNAを単離し、100 μ Lの滅菌水へ溶解した。抗F. IXa抗体キメラH鎖発現
- 15 ベクター、抗F. IXa抗体キメラL鎖発現ベクター、抗F. X抗体キメラH鎖発現ベクター、そして抗F. X抗体キメラL鎖発現ベクターを、それぞれpcDNA4-g4IXaHn、pcDNA4-g4IXaLn、pIND-g4XHnそしてpIND-g4XLnと名付けた。各プラスミド溶液は、使用するまで4℃で保存した。

20 〔実施例8〕 キメラ二種特異性抗体の動物細胞での発現

8-1. DNA溶液の調製

- 抗体右腕HL分子発現用ベクター (pcDNA4-g4IXaHnそしてpcDNA4-g4IXaLn) はテトラサイクリンにより発現誘導がかかる。テトラサイクリンが存在しない状況下で発現を完全に抑制する為にTetリプレッサーをコードするプラスミドpcDNA6/TR
- 25 (Invitrogen) が要求される。また、抗体左腕HL分子発現用ベクター (pIND-g4XHnそしてpIND-g4XLn) は昆虫ホルモンであるエクダイソン類似体 (ポナステ

ロンA) により発現誘導がかかる。このとき、ポナステロンAと反応し誘導を行うエクダイソンレセプターとレチノイドXレセプターをコードするプラスミド pVgRXR (Invitrogen) が要求される。従って、動物細胞のトランスフェクションの為に計6種類のプラスミドDNA混液を調製した。細胞培養液1 mLの為に、

- 5 pcDNA4-g4IXaHn、pcDNA4-g4IXaLn、pIND-g4XHnそしてpIND-g4XLnを各218.8 ng、pcDNA6/TRそしてpVgRXRを各1312.5 ng用いた。

8-2. 動物細胞のトランスフェクション

- ヒト胎児腎癌細胞由来HEK293H株 (Invitrogen) を10%FCS (MOREGATE) を含む
10 DMEM培地 (Invitrogen) へ懸濁し、 5×10^5 個/mLの細胞密度で接着細胞用12-wellプレート (CORNING) の各wellへ1mLずつ蒔きこみCO₂インキュベーター (37°C、5% CO₂) 内で培養した。8-1で調製したプラスミドDNA混液をトランスフェクション試薬、Lipofectamine 2000 (Invitrogen) 7 μ LとOpti-MEM I培地

- (Invitrogen) 250 μ Lの混液へ加えて室温20分間静置したものを各wellの細胞へ
15 投入し、4~5時間、CO₂インキュベーター (37°Cにて5% CO₂) 内でインキュベートした。

8-3. 二種特異性IgG抗体の発現誘導

- 前項のようにトランスフェクションした細胞培養液から培地を吸引除去し、
20 1 μ g/mLのテトラサイクリン (和光純薬工業) を含む1 mL CHO-S-SFM-II (Invitrogen) 培地を投入し、CO₂インキュベーター (37°C、5% CO₂) 内で1日培養して、抗体右腕HL分子の第一次発現誘導を行った。その後、培地を吸引除去し、一旦1 mL CHO-S-SFM-II培地にて洗浄した後、5 μ MのポナステロンA (Invitrogen) を含む1 mL CHO-S-SFM-II培地を投入し、CO₂インキュベーター
25 (37°C、5% CO₂) 内で2日ないし3日培養して、抗体左腕HL分子の第二次発現誘導を行い培地中へ二種特異性IgG抗体を分泌させた。培養上清は回収された後、

遠心分離（約2000g、5分間、室温）して細胞を除去し、必要に応じてMicrocon[®] YM-50（Millipore）で濃縮を行った。該サンプルは使用するまで4℃で保存した。

〔実施例 9〕 ヒトIgG 濃度の定量

- 5 Goat affinity purified antibody to human IgG Fc (Cappel) をcoating bufferにて1 μ g/mLに調製し、Nunc-Immuno plateに固相化した。Diluent buffer (D. B.) にてブロッキング処理した後、D. B. を用いて適当に希釈した培養上清サンプルを添加した。また、抗体濃度算出のためのスタンダードとして、1000 ng/mLから2倍系列でD. B. にて11段階希釈したヒトIgG4（ヒト型化抗TF抗体、W0
- 10 99/51743参照）を同様に添加した。3回洗浄したのち、Goat anti-human IgG, alkaline phosphatase (Biosource International) を反応させた。5回洗浄したのち、Sigma 104 (R) phosphatase substrate (Sigma-Aldrich) を基質として発色させ、吸光度リーダーModel 3550 (Bio-Rad Laboratories) により、参照波長655nmとして405nmの吸光度を測定した。Microplate Manager III (Bio-Rad
- 15 Laboretories) ソフトウェアを用いて、スタンダードの検量線から培養上清中のヒトIgG濃度を算出した。

〔実施例 10〕 F. VIIIa（活性化凝固第VIII因子）様活性アッセイ

- まず、二種特異性抗体のF. VIIIa様活性は、以下の酵素アッセイで評価した。
- 20 また、以下の反応は全て室温で行った。3.75 μ g/mLのFactor IX (Enzyme Research Laboratories) 40 μ Lと抗体溶液10 μ Lの混合液を96穴プレート中で1時間インキュベーションした。さらにその混合液に、10 ng/mLのFactor XIa (Enzyme Research Laboratories) 10 μ L, 50 μ g/mLのFactor X (Enzyme Research Laboratories) 20 μ L, 400 μ g/mLのphospholipid（実施例 5-3 参照）
- 25 5 μ L, 5mM CaCl₂と1mM MgCl₂を含むTBSB（以下、TBSB-Sと称す） 15 μ Lを添加し、酵素反応を開始させた。1時間反応させたのち、0.5M EDTA 10 μ Lを加えることに

より停止させた。

発色基質溶液50 μ Lをそれぞれのウェルに加えた後、0分、30分の405nm（参照波長655nm）における吸光度をModel 3550 Microplate Reader（Bio Rad Laboratories）により測定した。F. VIIIa様活性は、抗体添加の30分間の吸光度変化値から抗体無添加の30分間の吸光度変化値を引いた値で表した（図4および5参照）。

Phospholipidの溶媒にはTBSB、Factor XIa、Factor IX及びFactor Xの溶媒にはTBSB-Sを用いた。発色基質溶液は、添付説明書に従い溶解したテストチーム発色基質S-2222（Chromogenix）とポリブレン液（0.6 mg/L hexadimethrine bromide（Sigma））の1:1混合液である。

さらに、最も活性の高かったXB12/SB04について、F. VIIIa様活性の濃度依存性を測定した（図6）。

〔実施例11〕 血漿凝固アッセイ

15 血友病A血液の凝固能を二種特異性抗体が是正するか明らかにするために、F. VIII欠乏血漿を用いた活性化部分トロンボプラスチン時間（APTT）に対する同抗体の影響を検討した。様々な濃度の抗体溶液 50 μ L、F. VIII欠乏血漿（Biomerieu）50 μ L及びAPTT試薬（Dade Behring）50 μ Lの混合液を37℃で3分間加温した。凝固反応は20 mMのCaCl₂（Dade Behring）50 μ Lを同混合液に加えることにより開始させた。CR-A（Amelung）が接続されたKC10A（Amelung）により凝固するまでの時間を測定した（図7および8）。

さらに、最も凝固時間（APTT）の短縮効果の高かったXB12/SB04について濃度依存性を測定した（図9）。

25 〔実施例12〕 抗体精製

実施例8に記載の方法で得られた10mLの培養上清をCentricon (R) YM-50

- 57 -

(Millipore) により、1 mLまで濃縮した。これに10 μ Lの10% BSA、10 μ Lの1 % Tween (R) 20及び100 μ LのrProtein A SepharoseTM Fast Flow (Amersham Biosciences) を添加し、4℃で一晩転倒混和した。その溶液を0.22 μ mのフィルターカップUltrafree (R) -MC (Millipore) に移し、0.01% Tween (R) 20を含むTBS

5 500 μ Lにて3回洗浄後、rProtein A SepharoseTM樹脂を100 μ Lの 0.01% Tween (R) 20を含む10 mM HCl, pH2.0に懸濁して3分間静置したのち、抗体を溶出させた。直ちに、5 μ Lの1M Tris-HCl, pH8.0を加えて中和した。Microplate Manager III (Bio-Rad Laboratories) ソフトウェアを用いて、スタンダードの検量線から培養上清中のヒトIgG濃度を算出した。抗体濃度は実施例9に従い定

10 量した。

産業上の利用の可能性

本発明によりヘテロ分子を含む受容体に対してリガンド機能代替作用を有する

15 抗体が提供された。

また本発明により酵素および該酵素の基質の両方を認識する抗体であって、酵素活性を増強する補因子の機能を代替する抗体が提供された。

本発明の抗体は、血中での安定性が高く、抗原性も低いと考えられることから、医薬品となるものと大いに期待される。

請求の範囲

1. 機能蛋白質の代替機能を有する二種特異性抗体。
2. ヘテロ分子を含む受容体に対してリガンド機能代替活性を有する二種特異性抗体。
- 5 3. 受容体がサイトカイン受容体である請求項 2 に記載の抗体。
4. サイトカイン受容体がインターフェロン受容体である請求項 3 に記載の抗体。
5. インターフェロン受容体が I 型インターフェロン受容体である請求項 4 に記載の抗体。
- 10 6. I 型インターフェロン受容体が AR1 鎖及び AR2 鎖を含んでいることを特徴とする請求項 5 に記載の抗体。
7. ヘテロ分子を含む受容体が二量体である請求項 2 に記載の抗体。
8. 抗 AR1 鎖抗体の可変領域と、抗 AR2 鎖抗体の可変領域とを含む、請求項 6 に記載の抗体。
- 15 9. 抗 AR1 鎖抗体における下記 (a) のアミノ酸配列からなる可変領域と、抗 AR2 鎖抗体における下記 (b 1) ~ (b 10) のいずれかに記載のアミノ酸配列からなる可変領域とを含む、請求項 8 に記載の抗体。
 - (a) H 鎖可変領域が配列番号：1 に記載のアミノ酸配列であり、L 鎖可変領域が配列番号：2 に記載のアミノ酸配列
 - 20 (b 1) H 鎖可変領域が配列番号：7 に記載のアミノ酸配列であり、L 鎖可変領域が配列番号：8 に記載のアミノ酸配列
 - (b 2) H 鎖可変領域が配列番号：9 に記載のアミノ酸配列であり、L 鎖可変領域が配列番号：10 に記載のアミノ酸配列
 - (b 3) H 鎖可変領域が配列番号：19 に記載のアミノ酸配列であり、L 鎖可変領域が配列番号：20 に記載のアミノ酸配列
- 25

- (b 4) H鎖可変領域が配列番号：1 3に記載のアミノ酸配列であり、L鎖可変領域が配列番号：1 4に記載のアミノ酸配列
- (b 5) H鎖可変領域が配列番号：2 3に記載のアミノ酸配列であり、L鎖可変領域が配列番号：2 4に記載のアミノ酸配列
- 5 (b 6) H鎖可変領域が配列番号：5に記載のアミノ酸配列であり、L鎖可変領域が配列番号：6に記載のアミノ酸配列
- (b 7) H鎖可変領域が配列番号：1 7に記載のアミノ酸配列であり、L鎖可変領域が配列番号：1 8に記載のアミノ酸配列
- (b 8) H鎖可変領域が配列番号：1 5に記載のアミノ酸配列であり、L鎖可変領域が配列番号：1 6に記載のアミノ酸配列
- 10 (b 9) H鎖可変領域が配列番号：2 1に記載のアミノ酸配列であり、L鎖可変領域が配列番号：2 2に記載のアミノ酸配列
- (b 1 0) H鎖可変領域が配列番号：1 1に記載のアミノ酸配列であり、L鎖可変領域が配列番号：1 2に記載のアミノ酸配列
- 15 1 0. 抗AR1鎖抗体における下記(a)のアミノ酸配列からなる可変領域と、抗AR2鎖抗体における下記(b 1)～(b 3)のいずれかに記載のアミノ酸配列からなる可変領域とを含む、請求項8に記載の抗体。
- (a) H鎖可変領域が配列番号：3に記載のアミノ酸配列であり、L鎖可変領域が配列番号：4に記載のアミノ酸配列
- 20 (b 1) H鎖可変領域が配列番号：9に記載のアミノ酸配列であり、L鎖可変領域が配列番号：1 0に記載のアミノ酸配列
- (b 2) H鎖可変領域が配列番号：9に記載のアミノ酸配列であり、L鎖可変領域が配列番号：1 0に記載のアミノ酸配列
- (b 3) H鎖可変領域が配列番号：2 1に記載のアミノ酸配列であり、L鎖可変領域が配列番号：2 2に記載のアミノ酸配列
- 25 1 1. 請求項2～1 0のいずれかに記載の抗体を有効成分として含有する医薬

組成物。

- 1 2. 酵素、および該酵素の基質の両方を認識する抗体であって、酵素反応を増強する補因子の機能を代替する二種特異性抗体。
- 1 3. 酵素が蛋白質分解酵素である、請求項 1 2 に記載の抗体。
- 5 1 4. 蛋白質分解酵素が血液凝固線溶関連因子である、請求項 1 3 に記載の抗体。
- 1 5. 血液凝固第VIII因子および/または活性化血液凝固第VIII因子の作用を代替する作用を有する、請求項 1 4 に記載の抗体。
- 1 6. H鎖CDR3の配列が配列番号：4 2、4 6、5 0、5 4、5 8、6 2、6 6、
10 7 0、7 4、7 8、もしくは8 2のいずれかに記載のアミノ酸配列からなる相補性決定領域、またはこれと機能的に同等の相補性決定領域を有する、請求項 1 2～1 5 のいずれかに記載の抗体。
- 1 7. XB12またはXT04のいずれかのH鎖CDR3のアミノ酸配列からなる相補性決定領域またはこれと機能的に同等の相補性決定領域を有し、且つ、H鎖CDR3
15 の配列が配列番号：5 0、5 4、5 8、6 2、6 6、7 0、7 4、7 8
もしくは8 2のいずれかに記載のアミノ酸配列からなる相補性決定領域、またはこれと機能的に同等の相補性決定領域を有する、請求項 1 2～1 5 のいずれかに記載の抗体。
- 1 8. H鎖CDR配列が配列番号：4 0～4 2、4 4～4 6、4 8～5 0、5 2～
20 5 4、5 6～5 8、6 0～6 2、6 4～6 6、6 8～7 0、7 2～7 4、
7 6～7 8もしくは8 0～8 2のいずれかに記載のアミノ酸配列からなる相補性決定領域、またはこれと機能的に同等の相補性決定領域を有する、請求項 1 2～1 5 のいずれかに記載の抗体。
- 1 9. H鎖配列がXB12もしくはXT04のいずれかのアミノ酸配列からなる相補性決定領域、またはこれと機能的に同等の相補性決定領域を有し、且つ、H鎖
25 CDR配列が配列番号：4 8～5 0、5 2～5 4、5 6～5 8、6 0～6 2、

- 61 -

64～66、68～70、72～74、76～78もしくは80～82のいずれかのアミノ酸配列からなる相補性決定領域、またはこれと機能的に同等の相補性決定領域を有する、請求項12～15のいずれかに記載の抗体。

- 5 20. 請求項12～19のいずれかに記載の抗体および薬学的に許容される担体を含む組成物。
21. 出血、出血を伴う疾患、もしくは出血に起因する疾患の予防および/または治療に用いられる医薬組成物である、請求項20に記載の組成物。
22. 出血、出血を伴う疾患、もしくは出血に起因する疾患が、血液凝固第VIII因子および/または活性化血液凝固第VIII因子の活性の低下ないし欠損によって発症および/または進展する疾患である、請求項21に記載の医薬組成物。
- 10 23. 第VIII因子の活性の低下ないしは欠損によって発症および/または進展する疾患が、血友病Aである、請求項22に記載の医薬組成物。
- 15 24. 血液凝固第VIII因子および/または活性化血液凝固第VIII因子の活性の低下ないし欠損によって発症および/または進展する疾患が、血液凝固第VIII因子および/または活性化血液凝固第VIII因子に対するインヒビターが出現している疾患である、請求項22に記載の医薬組成物。
- 20 25. 血液凝固第VIII因子および/または活性化血液凝固第VIII因子の活性の低下ないし欠損によって発症および/または進展する疾患が、後天性血友病である、請求項22に記載の医薬組成物。
26. 血液凝固第VIII因子および/または活性化血液凝固第VIII因子の活性の低下によって発症および/または進展する疾患が、フォンビルブランド病である、請求項22に記載の医薬組成物。
- 25 27. 請求項12～19のいずれかに記載の抗体、または請求項20～26のいずれかに記載の組成物を投与する工程を含む、出血、出血を伴う疾患、

- 62 -

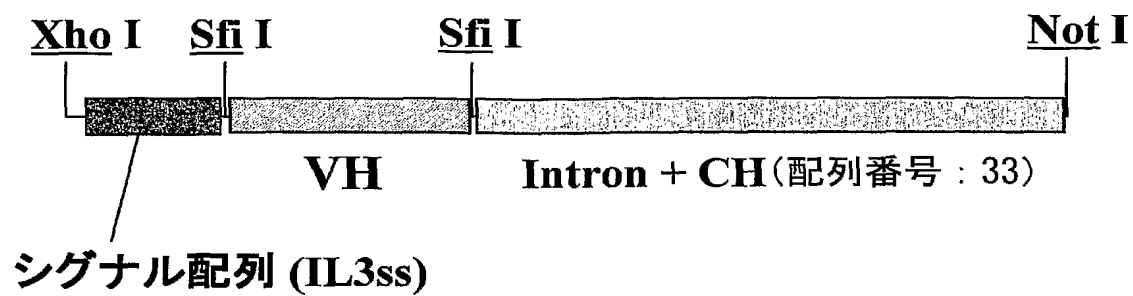
もしくは出血に起因する疾患を予防および/または治療する方法。

28. 請求項12～19のいずれかに記載の抗体の、請求項20～26のいずれかに記載の組成物の製造のための使用。

29. 少なくとも請求項12～19のいずれかに記載の抗体、または請求項20に記載の組成物を含む、請求項27に記載の予防および/または治療する方法に用いるためのキット。

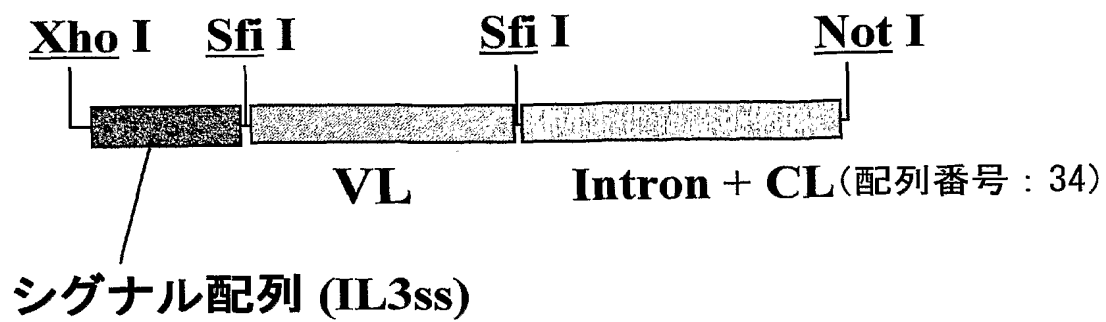
1 / 9

図 1



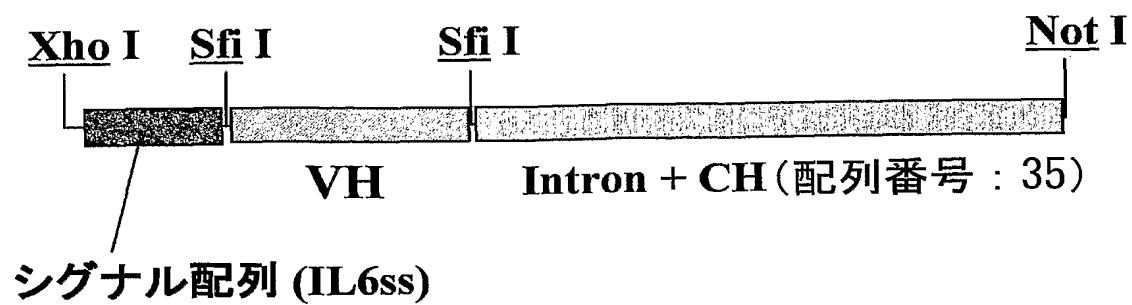
2 / 9

図 2



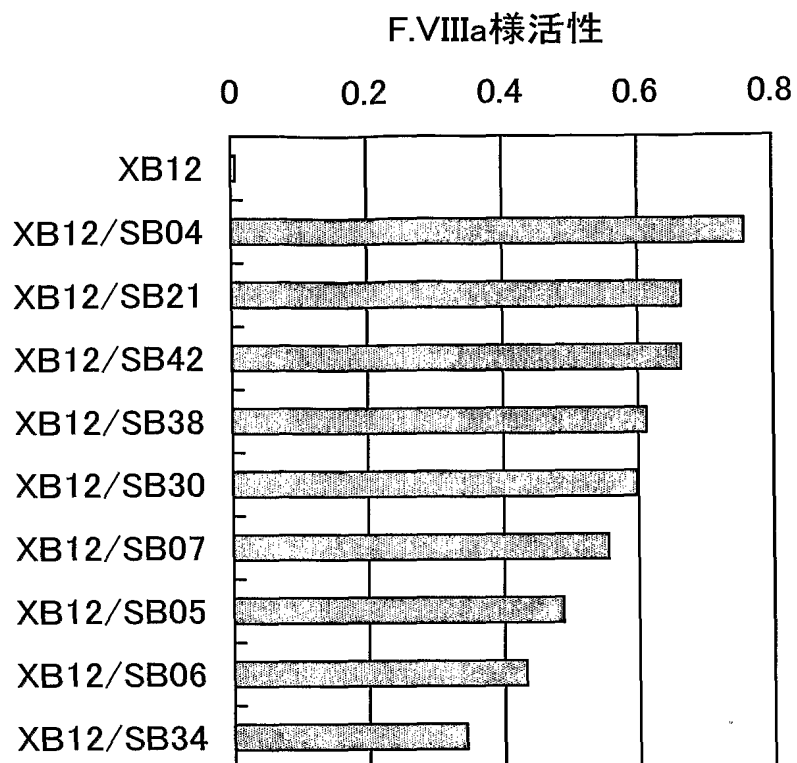
3 / 9

図 3



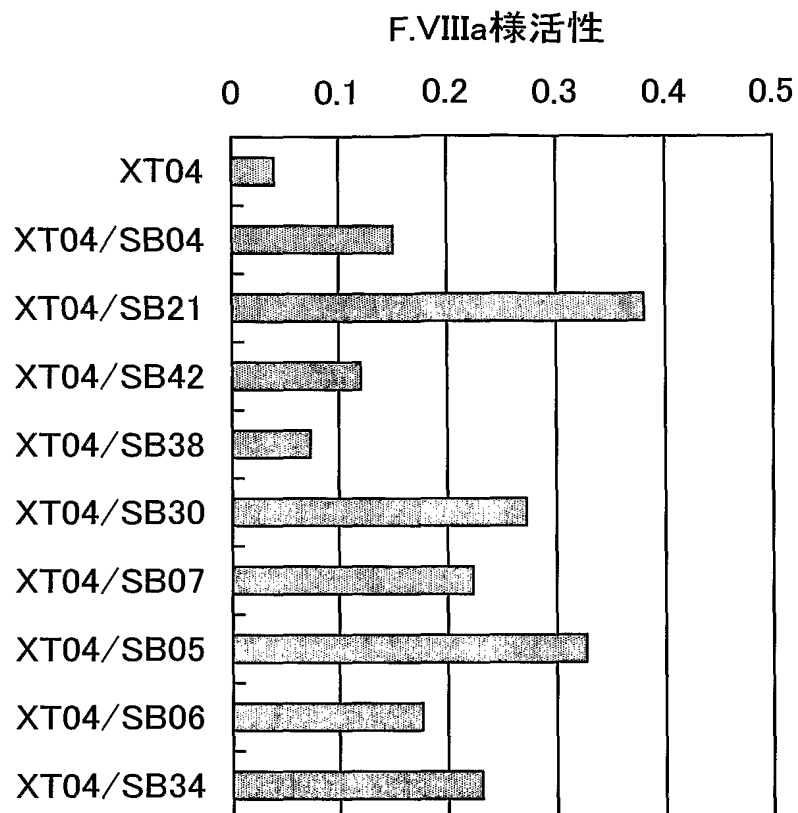
4 / 9

図 4



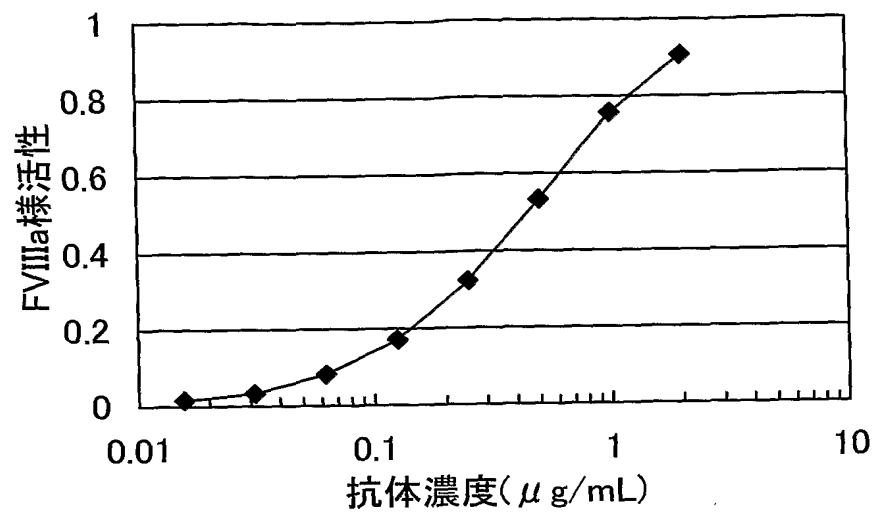
5 / 9

図 5



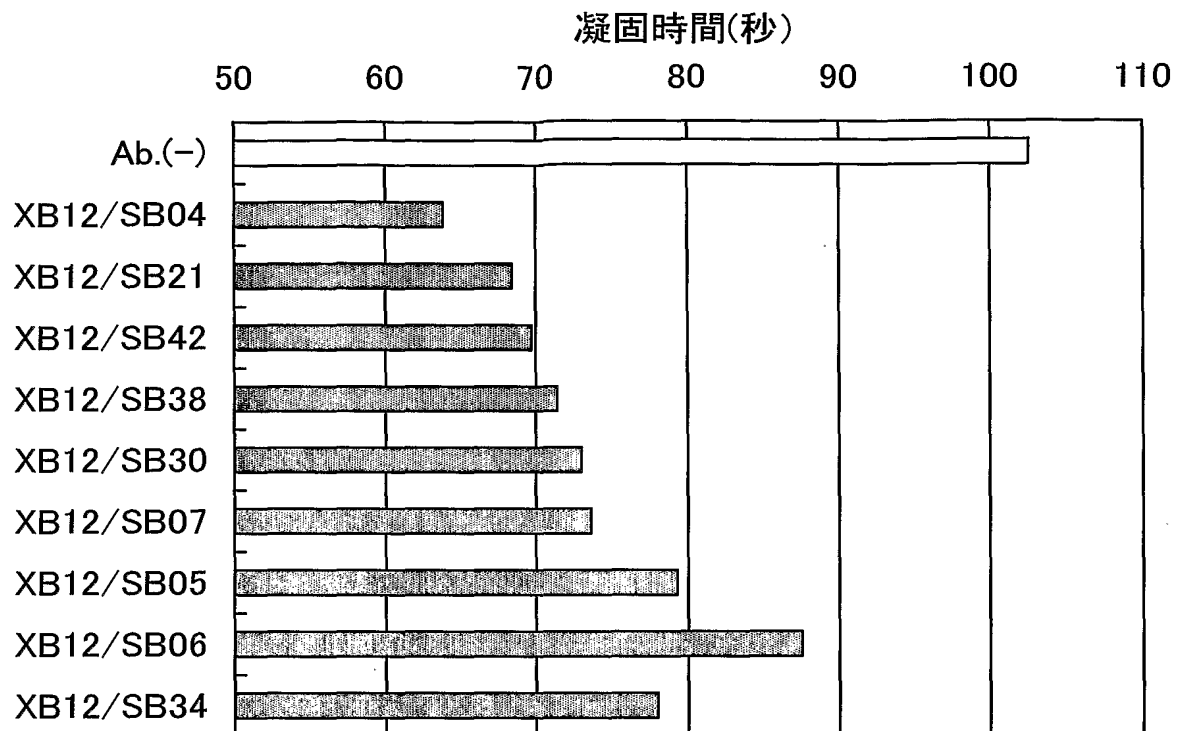
6 / 9

図 6



7 / 9

図 7



8 / 9

図 8

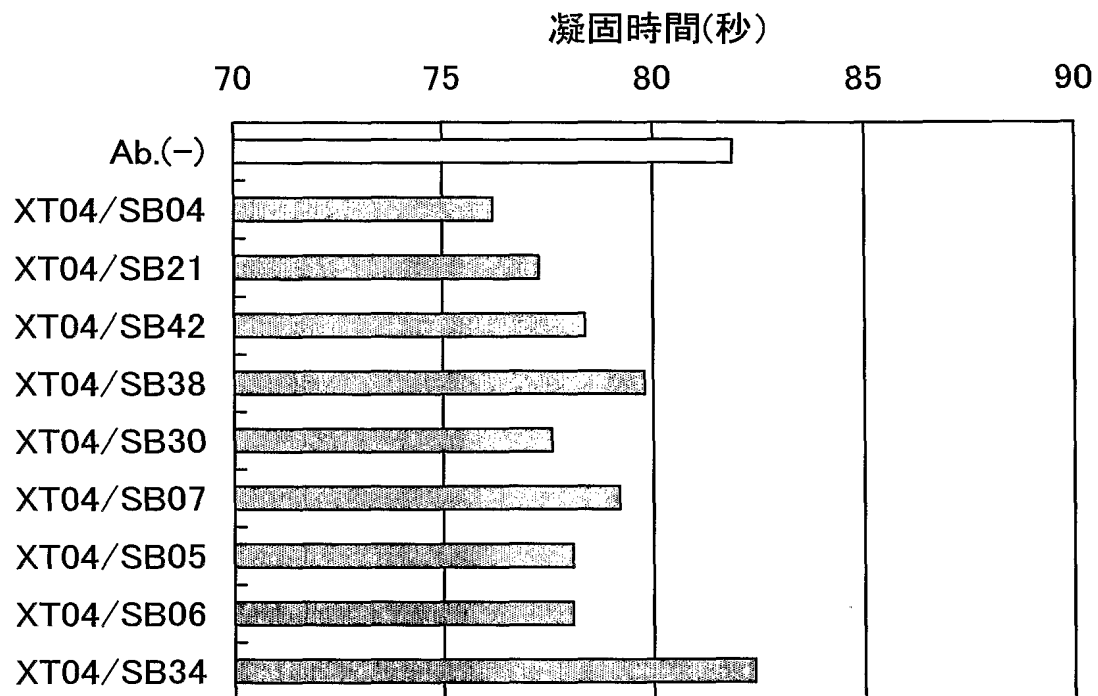
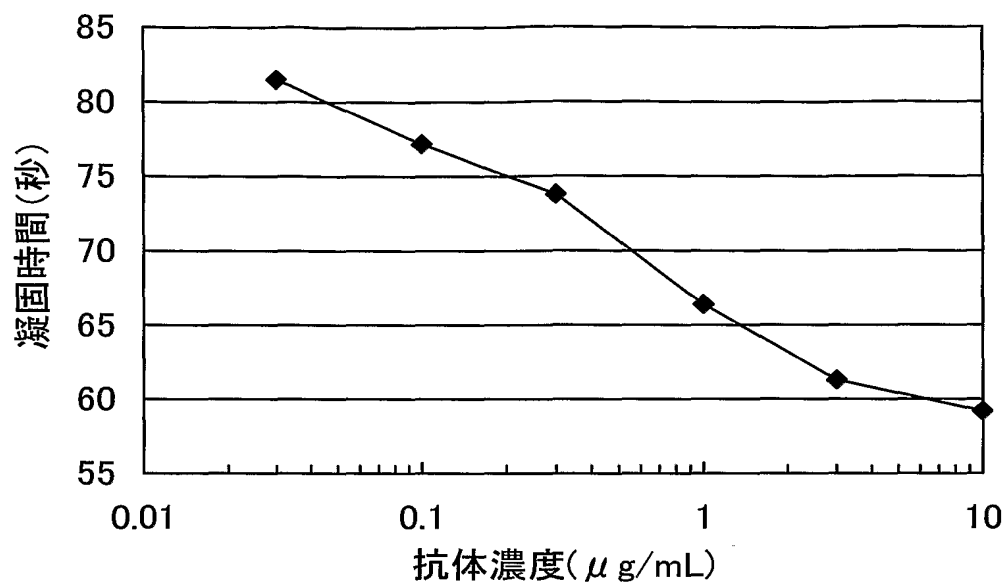


図 9



1 / 6 4

SEQUENCE LISTING

<110> CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

<120> Bispecific antibody having the ability of substitution for functional protein

<130> C1-A0313P

<160> 82

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Phe Tyr

20 25 30

Trp Ile Asn Trp Ile Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile

2 / 6 4

35

40

45

Gly Arg Ile Asp Pro Tyr Asp Ser Glu Thr Arg Tyr Asn Gln Lys Phe

50

55

60

Lys Asp Lys Ala Ile Leu Thr Val Asp Lys Tyr Ser Ser Thr Ala Tyr

65

70

75

80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Lys Gly Val Tyr Asp Gly His Trp Phe Phe Asp Val Trp Gly Ala

100

105

110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 2

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly

1

5

10

15

3 / 6 4

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala

20

25

30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile

35

40

45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50

55

60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Thr

65

70

75

80

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Arg Thr Pro Pro

85

90

95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg

100

105

<210> 3

<211> 119

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Glu Lys Pro Gly Ala

1

5

10

15

4 / 6 4

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Ser Asp Tyr

20

25

30

Asn Met Asn Trp Val Lys Gln Ser Asn Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile

35

40

45

Gly Asn Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe

50

55

60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Leu Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65

70

75

80

Met Gln Leu Lys Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

85

90

95

Ala Arg Ser Arg Gly Trp Leu Leu Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly

100

105

110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ala

115

<210> 4

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5 / 6 4

<400> 4

Asp Ile Leu Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Ile Asn
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Ala Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 5

<211> 117

<212> PRT

6 / 6 4

<213> Homo sapiens

<400> 5

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Arg Pro Gly Val

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr

20 25 30

Ala Ile His Trp Val Arg Gln Ser His Ala Gln Ser Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Val Ile Gly Thr Tyr Ser Gly Asn Arg Asn Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ala Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Ser Ala Gly Tyr Ser Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Ser

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

7 / 6 4

<210> 6

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly

1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser

20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro

50 55 60

Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly

85 90 95

Lys His Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

8 / 6 4

100

105

110

<210> 7

<211> 119

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Gly Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr

1

5

10

15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Tyr

20

25

30

Leu Ile Glu Trp Ile Arg Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35

40

45

Gly Val Ile Asn Pro Gly Ser Gly Asn Ser Lys Ser Ser Lys Asn Leu

50

55

60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr

65

70

75

80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

85

90

95

9 / 6 4

Ala Arg Ser Gly Val Tyr Gly Ser Ser Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100

105

110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

115

<210> 8

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly

1

5

10

15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser

20

25

30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser

35

40

45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro

50

55

60

Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65

70

75

80

1 0 / 6 4

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly

85

90

95

Thr His Phe Pro Gln Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100

105

110

Arg

<210> 9

<211> 118

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Gly Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr

1

5

10

15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Tyr

20

25

30

Leu Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Asp Trp Ile

35

40

45

Gly Met Ile Asn Pro Gly Ser Gly Gly Thr Lys Cys Asn Lys Lys Phe

1 1 / 6 4

50

55

60

Lys Gly Lys Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65

70

75

80

Met His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

85

90

95

Ala Arg Ser Gly Trp Val Ser Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100

105

110

Ser Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 10

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly

1

5

10

15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser

20

25

30

1 2 / 6 4

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser

35

40

45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro

50

55

60

Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65

70

75

80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly

85

90

95

Thr His Phe Pro Gln Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

100

105

110

Arg

<210> 11

<211> 118

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Val Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr

1

5

10

15

1 3 / 6 4

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Tyr

20

25

30

Leu Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Asp Trp Ile

35

40

45

Gly Met Ile Asn Pro Gly Ser Gly Gly Thr Lys Cys Asn Lys Lys Phe

50

55

60

Lys Gly Lys Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65

70

75

80

Met His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

85

90

95

Ala Arg Ser Gly Trp Val Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100

105

110

Ser Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 12

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

1 4 / 6 4

<400> 12

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly

1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser

20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro

50 55 60

Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly

85 90 95

Thr His Phe Pro Gln Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

100 105 110

Arg

1 5 / 6 4

<210> 13

<211> 117

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Arg Pro Gly Val

1

5

10

15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Arg Phe Thr Asp Tyr

20

25

30

Ala Ile His Trp Val Lys Gln Ser His Ala Lys Ser Leu Glu Trp Ile

35

40

45

Gly Val Ile Ser Thr Tyr Tyr Gly Asn Thr Arg Tyr Asn Gln Lys Phe

50

55

60

Lys Gly Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65

70

75

80

Met Glu Leu Ala Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Val Ile Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Arg Ser Gly Gly Ser Leu Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser

100

105

110

1 6 / 6 4

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 14

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly

1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser

20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro

50 55 60

Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly

1 7 / 6 4

85

90

95

Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100

105

110

Arg

<210> 15

<211> 117

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Arg Pro Gly Val

1

5

10

15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr

20

25

30

Ala Met His Trp Val Lys Gln Ser His Ala Lys Ser Leu Glu Trp Ile

35

40

45

Gly Val Ile Ser Thr Tyr Tyr Ser Asn Thr Arg Tyr Asn Gln Lys Phe

50

55

60

18 / 64

Lys Gly Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65

70

75

80

Met Glu Leu Ala Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys

85

90

95

Val Arg Ser Gly Gly Ser Asn Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser

100

105

110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 16

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly

1

5

10

15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser

20

25

30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser

35

40

45

19/64

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro

50

55

60

Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65

70

75

80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly

85

90

95

Thr His Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100

105

110

Arg

<210> 17

<211> 117

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Arg Pro Gly Val

1

5

10

15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Ser Tyr Lys Phe Thr Asp Tyr

20 / 64

20

25

30

Ala Met His Trp Val Lys Gln Ser His Ala Lys Ser Leu Glu Trp Ile

35

40

45

Gly Val Ile Ser Thr Tyr Tyr Gly Asn Val Lys Tyr Asn Gln Lys Phe

50

55

60

Lys Gly Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65

70

75

80

Met Glu Leu Ala Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Arg Ser Ser Gly Ser Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser

100

105

110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 18

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

2 1 / 6 4

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly

1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser

20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro

50 55 60

Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly

85 90 95

Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

Arg

<210> 19

<211> 119

22 / 64

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Tyr

20 25 30

Leu Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Pro Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Val Ile Asn Pro Gly Ser Gly Asn Ile Arg Tyr Asn Gly Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Arg Asp Ala Tyr Tyr Val Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

2 3 / 6 4

115

<210> 20

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly

1

5

10

15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser

20

25

30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser

35

40

45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro

50

55

60

Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65

70

75

80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly

85

90

95

2 4 / 6 4

Thr His Phe Pro Gln Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

100

105

110

Arg

<210> 21

<211> 119

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Glu Ala Glu Leu Val Arg Pro Glu Thr

1

5

10

15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Arg Asn Tyr

20

25

30

Leu Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35

40

45

Gly Val Ile Asn Pro Gly Ser Gly Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe

50

55

60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65

70

75

80

2 5 / 6 4

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

85

90

95

Ala Arg Asp Gly Tyr Tyr Leu Gly Thr Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100

105

110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 22

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Asp Ile Val Leu Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly

1

5

10

15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser

20

25

30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser

35

40

45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro

2 6 / 6 4

50

55

60

Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65

70

75

80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly

85

90

95

Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100

105

110

Arg

<210> 23

<211> 119

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr

1

5

10

15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ile Asn Asn

20

25

30

27 / 64

Leu Ile Glu Trp Val Gln Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35

40

45

Gly Val Ile Asn Pro Gly Ser Gly Asn Val Lys Tyr Asn Glu Lys Phe

50

55

60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65

70

75

80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

85

90

95

Ala Arg Asp Gly Tyr Tyr Leu Gly Thr Met Asp His Trp Gly Gln Gly

100

105

110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 24

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly

1

5

10

15

28 / 64

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser

20

25

30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser

35

40

45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro

50

55

60

Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65

70

75

80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly

85

90

95

Thr His Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

100

105

110

Arg

<210> 25

<211> 117

<212> PRT

<213> Homo sapiens

29 / 64

<400> 25

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Arg Pro Gly Val
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Ser Tyr Lys Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Ala Met His Trp Val Lys Gln Ser His Ala Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Val Ile Ser Thr Tyr Tyr Gly Asn Val Lys Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ala Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Tyr Gly Ser Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

30 / 64

<210> 26

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly

1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser

20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro

50 55 60

Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly

85 90 95

Thr His Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

31 / 64

<210> 27

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 27

cagctatgaa atacctattg cc

22

<210> 28

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 28

cttttcataa tcaaaatcac cgg

23

<210> 29

<211> 19

<212> DNA

3 2 / 6 4

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 29

attgcctacg gcagccgct

19

<210> 30

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 30

aaatcaccgg aaccagagcc

20

<210> 31

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

3 3 / 6 4

<400> 31

ttactcgcgg cccagccggc catg

24

<210> 32

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 32

ggaattcggc ccccaggcc cactcacg

28

<210> 33

<211> 1215

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 33

ggcctcgggg gccagctttc tggggcaggc caggcctgac ctiggccttg gggcaggag

60

ggggctaagg tgaggcaggt ggccgagcc aggtgcacac ccaatgccca tgagcccaga

120

cactggacgc tgaacctcgc ggacagttaa gaaccaggc gcctctgcgc cctgggccc

180

3 4 / 6 4

gctctgtccc acaccgcggt cacatggcac caccctctctt gcagcttcca ccaagggccc 240

atccgtcttc cccctggcgc cctgctccag gagcacctcc gagagcacag ccgcccctggg 300

ctgccctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg tcgtggaact caggcgccct 360

gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtc tcaggactct actccctcag 420

cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcacgaag acctacacct gcaacgtaga 480

tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gagagttgag tccaaatatg gtcccccatg 540

cccaccatgc ccagcacctg agttcctggg gggaccatca gtcttccctgt tcccccaaa 600

acccaaggac actctcatga tctcccggac ccctgaggtc acgtgcgtgg tggcggacgt 660

gagccaggaa gaccccgagg tccagttcaa ctggtacgtg gatggcgtgg aggtgcataa 720

tgccaagaca aagccgcggg aggagcagtt caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct 780

caccgtcctg caccaggact ggctgaacgg caaggagtac aagtgcagg tctccaacaa 840

aggcctcccg tcttccatcg agaaaacat ctccaaagcc aaagggcagc cccgagagcc 900

acagggtgtg accctgcccc catcccagga ggagatgacc aagaaccagg tcagcctgtg 960

3 5 / 6 4

gtgccctggc aaaggttcti accccagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca 1020
gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct cttcttctct 1080
ctacagcagg ctaaccgtgg acaagagcag gtggcaggag gggaatgtct tctcatgctc 1140
cgtgatgcat gaggtctctgc acaaccacta cacacagaag agcctctccc tgtctctggg 1200
taaatgagcg gccgc 1215

<210> 34

<211> 684

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 34

ggcctcgggg gccgaattcc taaactctga gggggctcgga tgacgtggcc attctttgcc 60
taaagcattg agtttactgc aaggtcagaa aagcatgcaa agccctcaga atggctgcaa 120
agagctccaa caaaacaatt tagaacttta ttaaggaata gggggaagct aggaagaaac 180
tcaaaacatc aagatitttaa atacgcttct tggctctcctt gctataatta tctgggataa 240
gcatgctgtt ttctgtctgt ccctaacaatg cctgtgatt atccgcaaac aacacacca 300

3 6 / 6 4

agggcagaac ttgtttactt aaacaccatc ctgtttgctt ctttccicag gaactgtggc 360
tgcaccatct gtcttcatct tcccgccatc tgatgagcag ttgaaatctg gaactgcctc 420
tgttgtgtgc ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt ggaagggtgga 480
taacgcccic caatcgggia acicccagga gagtgtcaca gagcaggaca gcaaggacag 540
cacctacagc ctacagcagca ccctgacgct gagcaaagca gactacgaga aacacaaagt 600
ctacgccitgc gaagtcaccc atcagggcct gagctcgccc gtcacaaaga gcttcaacag 660
gggagagtgt tagagggcgg ccgc 684

<210> 35

<211> 1215

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 35

ggcctcgggg gcctcccagg ctctgggcag gcacaggcta ggtgccccta acccaggccc 60
tgcacacaaa ggggcagggtg ctgggctcag acctgccaag agccatatcc gggaggaccc 120
tgcccctgac ctaagcccac cccaaaggcc aaactctcca ctccctcagc tcggacacct 180

37 / 64

tctctectec cagattccag taactcecaa tcttctctct gcagcttcca ccaagggccc 240

atccgtcttc cccctggcgc cctgtctccag gagcacctcc gagagcacag ccgcccctggg 300

ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg tcgtggaact caggcgccct 360

gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtc tcaggactct actccctcag 420

cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcacgaag acctacacct gcaacgtaga 480

tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gagagttgag tccaaatatg gtcccccatg 540

cccaccaatgc ccagcacctg agttcctggg gggaccatca gtcttctgt tcccccaaa 600

accaaggac actctcatga tctcccgac cctgaggtc acgtgcgtgg tggtagacgt 660

gagccaggaa gaccccgagg tccagttcaa ctggtacgtg gatggcgtgg aggtgcataa 720

tgccaagaca aagccgcggg aggagcagti caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct 780

caccgtcctg caccaggact ggctgaacgg caaggagtac aagtgcagg tctccaacaa 840

aggcctcccg tcttccatcg agaaaacct ctccaaagcc aaagggcagc cccgagagcc 900

acaggtgtac accctgcccc catcccagtg cgagatgacc aagaaccagg tcagcctgtc 960

3 8 / 6 4

ctgcgcggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca 1020
gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct ccttcttctt 1080
cgtgagcagg ctaaccgtgg acaagagcag gtggcaggag gggaatgtct tctcatgctc 1140
cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacacagaag agcctctccc tgtctctggg 1200
taaatgagcg gccgc 1215

<210> 36

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 36

cgcaaatggg cggtaggcgt g

21

<210> 37

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

3 9 / 6 4

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 37

tagaaggcac agtcgagg

18

<210> 38

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 38

ctctgaatac tttcaacaag ttac

24

<210> 39

<211> 116

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 39

Met Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Thr

1

5

10

15

4 0 / 6 4

Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser

20

25

30

Gly Tyr Tyr Trp Thr Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Asn Leu Glu

35

40

45

Trp Ile Gly Tyr Ile Ser Phe Asp Gly Thr Asn Asp Tyr Asn Pro Ser

50

55

60

Leu Lys Asn Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Glu Asn Gln Phe

65

70

75

80

Phe Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr

85

90

95

Cys Ala Arg Gly Pro Pro Cys Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

100

105

110

Thr Val Ser Ala

115

<210> 40

<211> 6

<212> PRT

<213> Mus musculus

4 1 / 6 4

<400> 40

Ser Gly Tyr Tyr Trp Thr

1 5

<210> 41

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 41

Tyr Ile Ser Phe Asp Gly Thr Asn Asp Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Asn

1 5 10 15

<210> 42

<211> 6

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 42

Gly Pro Pro Cys Thr Tyr

1 5

<210> 43

<211> 120

<212> PRT

4 2 / 6 4

<213> Mus musculus

<400> 43

Met Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly

1 5 10 15

Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp

20 25 30

Asp Tyr Val His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp

35 40 45

Ile Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asp Gly Lys Thr Lys Tyr Ala Pro Lys

50 55 60

Phe Gln Asp Lys Ala Thr Met Thr Ser Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala

65 70 75 80

Tyr Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

85 90 95

Cys Val Arg Trp Arg Ile Tyr Tyr Gly Leu Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

115 120

4 3 / 6 4

<210> 44

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 44

Asp Asp Tyr Val His

1

5

<210> 45

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 45

Arg Ile Asp Pro Ala Asp Gly Lys Thr Lys Tyr Ala Pro Lys Phe Gln

1

5

10

15

Asp

<210> 46

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

4 4 / 6 4

<400> 46

Trp Arg Ile Tyr Tyr Gly Leu Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 47

<211> 123

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 47

Met Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly

1 5 10 15

Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr His

20 25 30

Phe Val Leu His Trp Val Lys Gln Asn Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp

35 40 45

Ile Gly Tyr Ile Ile Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys

50 55 60

Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala

65 70 75 80

4 5 / 6 4

Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr

85

90

95

Cys Ala Arg Gly Asn Arg Tyr Asp Val Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr

100

105

110

Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 48

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 48

His Phe Val Leu His

1

5

<210> 49

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 49

Tyr Ile Ile Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

1

5

10

15

46 / 64

Gly

<210> 50

<211> 13

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 50

Gly Asn Arg Tyr Asp Val Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 51

<211> 117

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 51

Met Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly

1 5 10 15

Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Val Ser Gly Phe Asn Ile Gln Asp

20 25 30

Asn Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp

4 7 / 6 4

35

40

45

Ile Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Arg Tyr Asp Pro Lys

50

55

60

Phe Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Ile Ser Ser Asn Thr Thr

65

70

75

80

Cys Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

85

90

95

Cys Ala Ser Pro Tyr Tyr Pro Leu Gly Cys Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100

105

110

Val Thr Val Ser Ala

115

<210> 52

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 52

Asp Asn Tyr Met His

1

5

48 / 64

<210> 53

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 53

Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Arg Tyr Asp Pro Lys Phe Gln

1

5

10

15

Gly

<210> 54

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 54

Pro Tyr Tyr Pro Leu Gly Cys

1

5

<210> 55

<211> 116

<212> PRT

<213> Mus musculus

49 / 64

<400> 55

Met Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly

1 5 10 15

Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu

20 25 30

Asn Thr Ile Tyr Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp

35 40 45

Ile Gly Ser Ile Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr

50 55 60

Leu Thr Ile Asp Lys Ser Ser Ser Ser Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser

65 70 75 80

Leu Thr Ser Glu Glu Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly Gly

85 90 95

Arg Gly Lys Pro Tyr Tyr Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu

100 105 110

Thr Val Ser Ser

115

<210> 56

5 0 / 6 4

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 56

Glu Asn Thr Ile Tyr

1

5

<210> 57

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 57

Ser Ile Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp

1

5

10

<210> 58

<211> 12

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 58

Ser Gly Gly Arg Gly Lys Pro Tyr Tyr Phe Asp Ser

1

5

10

51 / 64

<210> 59

<211> 117

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 59

Met Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ser Glu Leu Val Lys Pro Gly

1

5

10

15

Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp

20

25

30

Asn Tyr Met His Trp Ile Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp

35

40

45

Ile Gly Arg Ile Asp Pro Gly Asn Gly Asn Ser Arg Tyr Asp Pro Lys

50

55

60

Phe Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala

65

70

75

80

Tyr Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

85

90

95

Cys Ala Ser Pro Tyr Tyr Pro Leu Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100

105

110

5 2 / 6 4

Val Thr Val Ser Ala

115

<210> 60

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 60

Asp Asn Tyr Met His

1

5

<210> 61

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 61

Arg Ile Asp Pro Gly Asn Gly Asn Ser Arg Tyr Asp Pro Lys Phe Gln

1

5

10

15

Gly

<210> 62

5 3 / 6 4

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 62

Pro Tyr Tyr Pro Leu Gly Tyr

1

5

<210> 63

<211> 114

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 63

Met Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly

1

5

10

15

Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Val Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp

20

25

30

Asp Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp

35

40

45

Ile Gly Arg Ile Asp Pro Thr Asn Gly Asn Pro Ala Tyr Ala Pro Lys

50

55

60

5 4 / 6 4

Phe Gln Asp Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Ile Thr Ala

65

70

75

80

Tyr Leu Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

85

90

95

Cys Thr Gly Ser Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val

100

105

110

Ser Ala

<210> 64

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 64

Asp Asp Tyr Ile His

1

5

<210> 65

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

5 5 / 6 4

<400> 65

Arg Ile Asp Pro Thr Asn Gly Asn Pro Ala Tyr Ala Pro Lys Phe Gln

1 5 10 15

Asp

<210> 66

<211> 4

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 66

Ser Phe Ala Tyr

1

<210> 67

<211> 114

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 67

Met Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly

1 5 10 15

Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp

5 6 / 6 4

20

25

30

Asp Tyr Val His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp

35

40

45

Ile Gly Arg Ile His Pro Ala Asn Gly Asn Pro Gln Tyr Ala Pro Lys

50

55

60

Phe Gln Asp Lys Ala Thr Ile Ile Ile Gly Thr Ala Ser Asn Thr Thr

65

70

75

80

Tyr Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

85

90

95

Cys Ala Gly Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val

100

105

110

Ser Ala

<210> 68

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 68

5 7 / 6 4

Asp Asp Tyr Val His

1 5

<210> 69

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 69

Arg Ile His Pro Ala Asn Gly Asn Pro Gln Tyr Ala Pro Lys Phe Gln

1 5 10 15

Asp

<210> 70

<211> 4

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 70

Pro Phe Ala Tyr

1

<210> 71

<211> 116

58/64

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 71

Met Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser

1 5 10 15

Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser

20 25 30

Asn Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu

35 40 45

Trp Met Gly Tyr Ile Asn Tyr Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Pro Ser

50 55 60

Leu Lys Asn Arg Ile Ser Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe

65 70 75 80

Phe Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr

85 90 95

Cys Ala Arg Gly Gly Ala Phe Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

100 105 110

Thr Val Ser Ala

5 9 / 6 4

115

<210> 72

<211> 6

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 72

Ser Asn Tyr Tyr Trp Asn

1

5

<210> 73

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 73

Tyr Ile Asn Tyr Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Asn

1

5

10

15

<210> 74

<211> 6

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 74

60 / 64

Gly Gly Ala Phe Thr Tyr

1

5

<210> 75

<211> 114

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 75

Met Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly

1

5

10

15

Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Ile Thr Asp

20

25

30

Asn Lys Met Asp Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp

35

40

45

Ile Gly Tyr Ile Ser Pro Asn Asn Gly Asp Ile Gly Tyr Asn Arg Lys

50

55

60

Phe Arg Asn Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala

65

70

75

80

Tyr Met Glu Leu His Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr

85

90

95

6 1 / 6 4

Cys Ala Arg His Arg Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val

100

105

110

Ser Ala

<210> 76

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 76

Asp Asn Lys Met Asp

1

5

<210> 77

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 77

Tyr Ile Ser Pro Asn Asn Gly Asp Ile Gly Tyr Asn Arg Lys Phe Arg

1

5

10

15

Asn

6 2 / 6 4

<210> 78

<211> 4

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 78

His Arg Ala Tyr

1

<210> 79

<211> 121

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 79

Met Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly

1

5

10

15

Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr

20

25

30

Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp

35

40

45

6 3 / 6 4

Val Ala Tyr Ile Ser Asn Gly Gly Ala Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser

50

55

60

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu

65

70

75

80

Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr

85

90

95

Cys Ala Arg Gly Gly Tyr Arg Tyr Pro Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly

100

105

110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 80

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 80

Thr Tyr Ala Met Ser

1

5

<210> 81

<211> 17

6 4 / 6 4

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 81

Tyr Ile Ser Asn Gly Gly Ala Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 82

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 82

Gly Gly Tyr Arg Tyr Pro Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5 10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/13062

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/09, C07K16/18, A61K39/395, A61P7/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/09, C07K16/18, A61K39/395, A61P7/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus (JOIS), MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y A	Francois, C. et al., Construction of a bispecific antibody reacting with the alpha- and beta-chains of the human IL-2 receptor., J.Immunol., Vol.150, No.10, pages 4610 to 4619, (1993)	1-3 4-11 12-26, 28, 29
X Y A	Lu, D. et al., Di-diabody: a novel tetravalent bispecific antibody molecule by design., J.Immunol. Methods, Vol.279, No.1-2, pages 219 to 232, (2003 August)	1 2-11 12-26, 28, 29
X Y A	Lu, D. et al., Fab-scFv fusion protein: an efficient approach to production of bispecific antibody fragments., J.Immunol.Methods, Vol.267, No.2, pages 213 to 226, (2002)	1 2-11 12-26, 28, 29

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
10 November, 2003 (10.11.03)

Date of mailing of the international search report
25 November, 2003 (25.11.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/13062

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Kim, S.H. et al., Mammalian type I interferon receptors consists of two subunits: IFNaR1 and IFNaR2, Gene, Vol.196, No.1-2, pages 279 to 286, (1997)	2-11
X A	Segal, D.M. et al., Introduction: bispecific antibodies., J.Immunol.Methods, Vol.248, No.1-2, pp.1-6, (2001)	1 2-26,28,29
X A	Carter P., Bispecific human IgG by design., J.Immunol.Methods, Vol.248, No.1-2, pp.7-15, (2001)	1 2-26,28,29

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/13062

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 27
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
It pertains to methods for treatment of the human body by therapy.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Claims have:

(1) inventions relating to "a bispecific antibody having an activity of substituting for the ligand function of a receptor containing heteromolecules" as set forth in claims 2 to 11; and

(2) inventions relating to "a bispecific antibody recognizing both of an enzyme and its substrate" as set forth in claims 12 to 26, 28 and 29.

These groups of inventions are common to each other in nothing but being a bispecific antibody (double specific antibody). As reported by the following documents 1 and 2, however, double specific antibodies had been publicly known before the application and thus cannot be (continued to extra sheet)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/13062

Continuation of Box No. II of continuation of first sheet(1)

considered as a special technical feature in accordance with PCT Rule 13.2. Thus, these groups of inventions are not considered as being so linked as to form a single general inventive concept. Such being the case, claims of the present case have 2 groups of inventions.

Document 1: J. Immunol., Vol.150, No.10, pp.4610-4619 (1993)

Document 2: J. Immunol Methods, Vol.248, No.1-2, pp.1-6 (2001)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl⁷ C12N15/09、C07K16/18、A61K39/395、A61P7/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl⁷ C12N15/09、C07K16/18、A61K39/395、A61P7/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
JSTPlus (JOIS)、MEDLINE (STN)、WPI (DIALOG)、BIOSIS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y A	Francois, C. et al., Construction of a bispecific antibody reacting with the alpha- and beta-chains of the human IL-2 receptor. J Immunol., Vol. 150, No. 10, pp. 4610-4619 (1993)	1-3 4-11 12-26, 28, 29
X Y A	Lu, D. et al., Di-diabody: a novel tetravalent bispecific antibody molecule by design. J Immunol Methods, Vol. 279, No. 1-2, pp. 219-232 (2003 Aug)	1 2-11 12-26, 28, 29

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

10.11.03

国際調査報告の発送日

25.11.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田村 明 照

4 B

8 4 1 2

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y A	Lu, D. et al., Fab-scFv fusion protein: an efficient approach to production of bispecific antibody fragments. J Immunol Methods, Vol. 267, No. 2, pp. 213-226 (2002)	1 2-11 12-26, 28, 29
Y	Kim, S. H. et al., Mammalian type I interferon receptors consists of two subunits: IFN α R1 and IFN α R2 Gene, Vol. 196, No. 1-2, pp. 279-286 (1997)	2-11
X A	Segal, D. M. et al., Introduction: bispecific antibodies. J Immunol Methods, Vol. 248, No. 1-2, pp. 1-6 (2001)	1 2-26, 28, 29
X A	Carter P., Bispecific human IgG by design. J Immunol Methods, Vol. 248, No. 1-2, pp. 7-15 (2001)	1 2-26, 28, 29

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 27 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

人体の治療方法に係る発明が記載されている。

2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

請求の範囲には、

(1) 請求の範囲2-11に記載の「ヘテロ分子を含む受容体に対してリガンド機能代替活性を有する二重特異性抗体」に関連する発明。

(2) 請求の範囲12-26、28、29に記載の「酵素および該酵素の基質の両方を認識する二重特異性抗体」に関連する発明。

が記載されており、これらの発明は二重特異性抗体(二重特異性抗体)である点でのみ共通する。しかしながら、下記文献1、2にも記載されているように、二重特異性抗体は出願前公知であり、この点はPCT規則13.2における特別な技術的特徴であるとはいえないから、これらの発明は単一の一般的発明概念を形成するように連関するものとは認められない。よって、この出願の請求の範囲には2つの発明が記載されている。

文献1: J Immunol., Vol. 150, No. 10, pp. 4610-4619 (1993)

文献2: J Immunol Methods, Vol. 248, No. 1-2, pp. 1-6 (2001)

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。